

Keringő extracelluláris vezikula-asszociált mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata mellékvesekéreg-daganatban szenvedő betegekben

Doktori értekezés

Dr. Perge Pál

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bödör Csaba, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Orbán Tamás, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Horváth Csaba, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Mészáros Szilvia, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Papp Gergő, PhD, tudományos munkatárs

Budapest
2018

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)	8
1. 1. A mellékvesekéreg daganatai	8
1.1.1. A mellékvesekéreg carcinoma	9
1.1.1.1. Epidemiológia	9
1.1.1.2. Patogenezis.....	10
1.1.1.2.1. A mellékvesekéreg-rákban leggyakrabban észlelt molekuláris eltérések, érintett útvonalak.....	10
1.1.1.3. Diagnózis.....	14
1.1.1.3.1. Hormonális aktivitás	14
1.1.1.3.2. Képalkotó vizsgálatok	15
1.1.1.3.3. Szövettani vizsgálat.....	17
1.1.1.4. Stádiumbeosztás és prognózis	18
1.1.1.5. Terápia és utánkövetés	20
1.1.1.5.1. Lokális ACC.....	20
1.1.1.5.2. Kiterjedt, metasztatikus ACC.....	21
1.1.1.5.3. Utánkövetés	22
1.2. A mikroRNS-ek biológiája.....	23
1.2.1. Az RNS-interferencia jelensége.....	23
1.2.2. A miRNS-ek nevezéktana.....	23
1.2.3. A miRNS-ek bioszintézise és hatásmechanizmusai	24
1.2.3.1. A miRNS-ek bioszintézise	24
1.2.3.2. A miRNS-ek génexpresszióra kifejtett biológiai hatásai	26
1.2.4. Az extracelluláris miRNS-ek	29
1.3. Az extracelluláris vezikulák	31
1.4. MikroRNS-ek a mellékvesekéreg daganataiban.....	33
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	37

3. MÓDSZEREK.....	39
3.1. Betegek és plazmaminták	39
3.2. Extracelluláris vezikula izolálás és EV preparátumok vizsgálata	45
3.2.1. Extracelluláris vezikula izolálás	45
3.2.2. EV preparátumok vizsgálata	46
3.2.2.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia	46
3.2.2.2. Áramlási citometria	47
3.2.2.3. EV méreteloszlás meghatározás.....	48
3.3. RNS-izolálás és mikroRNS expressziós vizsgálatok.....	48
3.3.1. Plazma EV-asszociált RNS izolálás	48
3.3.2. Nagy áteresztőképességű miRNS expressziós mérések	50
3.3.3. Validálás egyedi kvantitatív PCR mérésekkel.....	51
3.4. Statisztikai elemzés.....	52
4. EREDMÉNYEK.....	53
4.1. Extracelluláris vezikulák jellemzése	53
4.1.1. Extracelluláris vezikulák vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal ...	53
4.1.2. Extracelluláris vezikulák felszíni markereinek kifejeződésének elemzése áramlási citometriával.....	54
4.1.3. Az extracelluláris vezikulák méreteloszlásának meghatározása dinamikus fényszórás méréssel	55
4.2. EV-asszociált miRNS expressziós mintázat vizsgálata mellékvesekéreg daganatokban.....	57
4.3. A miRNS expresszió vizsgálata RT-qPCR módszerrel.....	58
4.3.1. Mellékvesekéreg-adenoma és carcinoma összehasonlítása	58
4.3.2. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomák és kortizoltermelő jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok összehasonlítása	60
4.4. A mellékvesekéreg daganatok malignitásának jelzésére alkalmas minimálisan invazív biomarker miRNS-ek vizsgálata ROC-analízissel.....	66

4.5. Keringő EV-asszociált miRNS expresszió és kortizolszekréción paraméterek közötti korreláció vizsgálata	69
4.6. A kis dózisú dexametazon teszt miRNS-ek expresszióját befolyásoló hatásának vizsgálata	71
5. MEGBESZÉLÉS	72
5.1. EV-asszociált miRNS-ek expressziós mintázatának és diagnosztikus hatékonyságának vizsgálata mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganataiban.....	72
5.2. A „kit”-tel izolált EV preparátumok és az ultracentrifugálási protokoll alkalmazásával nyert EV-preparátumok összevetése	76
5.3. EV-asszociált miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata hormonálisan inaktív és kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban	78
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	85
8. SUMMARY	86
9. IRODALOMJEGYZÉK	87
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	115
10.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	115
10.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLODÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	116
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	118

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3' UTR:	3' nem átíródó régió (3' untranslated region)
5' UTR:	5' nem átíródó régió (5' untranslated region)
ACA:	Mellékvesekéreg (adrenocorticalis) adenoma
ACC:	Mellékvesekéreg (adrenocorticalis) carcinoma
ACTH:	Adrenokortikotróp hormon
AGO:	Argonaute
ANOVA:	variancia analízis (Analysis of Variance)
AUC:	Görbe alatti terület (Area under curve)
BWS:	Beckwith-Wiedemann-szindróma
cDNS:	Komplementer DNS
C-MTO:	Szénizotóppal jelölt metomidát
CPA:	Kortizoltermelő adrenocorticalis adenoma
CP-ACC:	Kortizoltermelő adrenocorticalis carcinoma
CT:	Komputertomográfia
dCT:	Küszöb ciklus szám változás (delta cycle threshold)
Dicer:	Helikáz RNáz mintával
DGCR8:	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DM2:	2-es típusú diabetes mellitus
DNS:	dezoxiribonukleinsav
EDP/M:	Etopozid doxorubicin ciszplatin/mitotán
EDTA:	etilén-diamin-tetraecetsav
ENSAT:	A Mellékvesekéreg-daganatok Kutatásának Európai Hálózata (European Network for the Study of Adrenal Tumors)
EV:	Extracelluláris vezikula

FAP:	Familiáris adenomatosus polyposis
FC:	Fold change
FDG:	Fluorodeoxiglükóz
GRE:	Glükokortikoid reszponzív element
HDL:	Magas denzitású lipoprotein (High density Lipoprotein)
HIF-1 α :	Hipoxia indukált faktor 1 alfa
HPF:	Nagy látótér (High power field)
HU:	Hounsfield egység
IGF2:	Inzulinszerű növekedési faktor 2
LDDT:	kis dózisú dexametazon teszt (low dose dexamethasone test)
LFS:	Li-Fraumeni-szindróma
LOH:	allélvesztés (loss of heterozigosity)
MEN-1:	multiplex endokrin neoplasia 1-es típusa
miRISC:	miRNS-indukálta csendesítő komplex
miRNS:	mikro-ribonukleinsav
MRI:	Mágnesesrezonancia-képalkotás
mRNS:	hírvivő RNS
MV:	Mikrovezikula
MVB:	Multivezikuláris test (Multivesicular body)
NFA:	Hormonálisan inaktív adrenocorticalis adenoma
oncomiR:	onkogén miRNS
PCR:	Polimeráz láncreakció (Polymerase chain reaction)
PET/CT:	Pozitronemissziós tomográfia/ Komputertomográfia
PBS:	foszfát-puffer-só (phosphate-buffered saline)

PCC:	phaeochromocytoma
PUMA:	p53 up-regulated modulator of apoptosis
RNS:	ribonukleinsav
ROC:	hatásfokmérő karakterisztika (Receiver operating characteristic)
RT-qPCR:	valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakció
SUV:	standardized uptake value
SF-1 fehérje:	steroidogenic factor 1 fehérje
T1:	T1-súlyozás
T2:	T2-súlyozás
TOP2A:	topoizomeráz-2A
TLDA:	TaqMan alacsony denzitású kártya (TaqMan Low Density Array)
TRBP:	TAR RNS-kötő fehérje (TAR RNA binding protein)
TS-miR:	tumor szuppresszor miRNS
UC:	Ultracentrifuga
UFC:	vizelet szabad kortizol (Urinary free cortisol)
UH:	Ultrahang
UICC:	Union for International Cancer Control
WHO:	World Health Organization
Wnt:	Wingless-asszociált integrációs hely (Wingless-related integration site)

1. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)

1. 1. A mellékvesekéreg daganatai

A mellékvesekéreg daganatai gyakoriak és előfordulások az életkorral párhuzamosan emelkedik [1]. Radiológiai és kórbonctani eredmények alapján idősebb életkorban a populáció 5-10%-a lehet érintett [2]. Döntő többségüket egyéb okból elvégzett képalkotó vizsgálatok alapján diagnosztizálják (incidentaloma). Az incidentalomák körülbelül kétharmada hormonálisan inaktív, nem-funkcionáló adenoma (NFA), így klinikai tüneteket általában nem okoz [3]. Ezzel szemben a ritka kortizoltermelő adrenocorticalis adenoma a Cushing-szindróma kialakítása révén jelentős morbiditással és mortalitással jár [1]. Az aldosterontermelő adenomák jóval gyakoribbak, az összes hypertonia 2-5 %-áért felelősek, jelentős cardiovascularis morbiditással és mortalitással társulnak [4]. A mellékvesekéreg rosszindulatú daganata, az adrenocorticalis carcinoma ritka, rossz prognózisú daganat [5]. Továbbiakban a kortizoltermelő mellékvesekéreg-adenoma és a mellékvesekéreg-rák fontosabb jellemzőit foglalom össze.

A Cushing-szindróma a tartósan emelkedett glükokortikoid szint következtében kialakuló tünetegyüttes. Leggyakoribb formája az exogén glükokortikoid kezelés hatására létrejövő iatrogén forma. Az endogén Cushing-szindróma ritka megbetegedés, incidenciája 2-3 fő/millió ember/év közé tehető [6]. Hátterében az esetek döntő többségében (70 %) az agyalapi mirigy ACTH (adrenokortikotropin) termelő adenomája áll. 15-20 %-ban ún. ectopiás ACTH-termelő (extrém ritkán CRH-termelő) daganat okozza. Az esetek körülbelül 15%-20 %-át mellékvesekéreg daganat okozza, ami leggyakrabban kortizoltermelő mellékvesekéreg adenoma (CPA), ritkán pedig kortizoltermelő mellékvesekéreg carcinoma. Szemben a hypophysis ACTH-termelő adenomája valamint ectopiás ACTH-termelés eseteivel, a mellékvesekéreg daganatai okozta Cushing-szindróma autonóm kortizoltermelés következménye, így ACTH-independens. A jóindulatú mellékvesekéreg adenoma kortizoltermelésének tünetei lassan és fokozatosan jelentkezik. A klasszikus tünetek közé tartozik, a centrális elhízás, a holdvilágarc, a plethora, a livid striák, a diabetes mellitus, a magas vérnyomás az izomgyengeség, az osteopenia és az osteoporosis, a pszichés eltérések és a

gonádműködési zavar. A kórkép megfelelő kezelés nélkül jelentős morbiditással és mortalitással jár a szív- és érrendszeri, thromboemboliás és anyagcsere szövődmények, illetve a fokozott fertőzéshajlam révén. Az adrenocorticalis adenoma (ACA) talaján kialakult Cushing-szindróma elsődleges terápiája a daganat teljes sebészi eltávolítása (adrenalectomia). A sikeres operáció a kortizolszintet gyorsan normalizálja, azonban az ellenoldali atrophias mellékvese miatt a hypadrenia megelőzése céljából hydrocortison adása javasolt. Adekvát kezelés esetén a betegség prognózisa jó.

1.1.1. A mellékvesekéreg carcinoma

1.1.1.1. Epidemiológia

Az adrenocorticalis carcinoma (ACC) ritka, agresszív viselkedésű daganat [5]. Az éves előfordulási gyakorisága 0,5-2 fő/millió ember/év közé tehető [7, 8]. Megjelenésében két életkori csúcs figyelhető meg. Az első csúcs a gyermekkor első, míg a második általában az élet negyedik és ötödik évtizede közé esik [9]. Epidemiológiai vizsgálatok alapján női nemben gyakrabban jelentkezik [10, 11]. A daganat kialakulásában rizikófaktoroként a férfiak körében a dohányzást, míg nőknél a fogamzásgátló alkalmazását írták le - különösen 25 éves életkor előtt kezdett terápia esetén [12]. A terhességben megfigyelhető relatíve fokozott incidencia is felveti az ösztrogén szerepét a patogenezisben [13]. Az ACC rossz prognózissal társul, az ötéves túlélés előrehaladott stádiumban alacsony, 15-30% közé tehető [14, 15].

1.1.1.2. Patogenezis

A mellékvesekéreg-rák patogenezisét az utóbbi években közölt tanulmányokból már egyre jobban ismerjük, azonban még nem rendelkezünk teljes mértékben átfogó képpel a tumor kialakulásának mechanizmusáról. A megismeréshez jelentős segítséget nyújthatnak a kimondottan ritka, öröklődő mellékvesekéreg-daganatra hajlamosító tumorszindrómák. Jelentőségüket fokozza az a megfigyelés, hogy ezen eltérések nagy részét sporadikus ACC-ben is leírták már. Az utóbbi években a nagy áteresztőképességű molekuláris vizsgálati technikák és a bioinformatika fejlődése révén eddig ismeretlen kóroki mechanizmusok megismerése is lehetővé válhatott.

1.1.1.2.1. A mellékvesekéreg-rákban leggyakrabban észlelt molekuláris eltérések, érintett útvonalak

Az örökletes daganatszindrómák közül a Li-Fraumeni-szindróma (LFS), a Beckwith-Wiedemann-szindróma (BWS) és a familiáris adenomatosus polyposis (FAP) hajlamosítanak mellékvesekéreg-rákra [5]. A daganatszindrómákhoz társuló ACC-k az összes eset töredék részét teszik ki. A multiplex endokrin neoplasia 1-es típusa (MEN-1), a Carney-komplex, a McCune-Albright-szindróma és a Lynch-szindróma jellemzően mellékvesekéreg-adenomával járnak együtt [16].

Az LFS autoszomális domináns módon öröklődő tumorszindróma, melynek hátterében a tumorprotein-53 (TP-53) gén deaktiváló mutációi állnak [17]. A gén a DNS-károsodás javításában és a kontrollált sejtosztódásban játszik elsődleges szerepet. A Brazíliában megfigyelhető fokozott gyermekkori ACC előfordulási gyakoriság hátterében egy konformáció változást okozó TP-53 mutáció áll [18].

A BWS patogenezisében a fokozott kifejeződésű inzulinszerű növekedési faktor 2 (IGF-2) játszik alapvető szerepet [19]. Génje az egyik leggyakrabban felülexpresszáldó gén ACC-ben [20]. A sejtciklus szabályozásában fontos szerepet betöltő ciklindependens kinázinhibitor 1C csökkent kifejeződését mind sporadikus, mind familiáris ACC esetén is leírták [21].

A FAP autoszomális domináns módon öröklődő, jellemzően fiatalkori vastagbél polypusokból kialakuló vastagbélrákkal járó daganatszindróma. Hátterében az axin adenomatosus polyposis coli (APC) gén mutációit írták le. Fontos kiemelni, hogy míg az APC mutációi ACC-ben nem ismertek, addig a gén által befolyásolt Wntless-asszociált integrációs hely (Wnt)/ β -katenin jelátviteli út érintettsége kiemelt szerepet játszik a mellékvesekéreg-rák patogenezisében [22].

A sporadikusan előforduló mellékvesekéreg-daganatok jelentősen gyakoribbak, mint az örökletes tumorszindrómákhoz társulók. Mindazonáltal fontos kiemelni, hogy az örökletes ACC-re hajlamosító eltérések jelentős részét sporadikus tumorokban is sikerült kimutatni.

A szomatikus TP53 mutációk a felnőttkori ACC esetek 25-30 %-ában mutathatóak ki [23]. Tekintettel arra, hogy ezen deaktiváló mutációk elsősorban nagyobb, előrehaladott mellékvesekéreg-rákokra jellemzőek, így nem meglepő, hogy jelenlétük rosszabb prognózissal jár együtt [16]. A gén a 17p13 kromoszóma régióban helyezkedik el, a locus allélvesztése (loss of heterozygosity, LOH) azonban az ACC esetek 75-80 %-ában fordul elő [21]. A 17p13 kromoszóma régióban elhelyezkedő, így szintén kieső funkciójú egyéb tumor szuppresszor gének okozhatják a jelentős eltérést a TP53 szomatikus mutációk és a LOH ACC-ben előforduló gyakorisága között.

A FAP hátterében álló APC mutációk ACC-ben nem ismertek, de a gén által befolyásolt Wnt/ β -katenin útvonal fokozott aktivitása mellékvesekéreg adenomáiban és carcinomáiban is gyakran jelentkezik [14]. Hátterében a β -katenin transzkripciós faktort kódoló CTNNB1 gén aktiváló mutációi állnak. A mutáció következményeként a Wnt ligandtól független, konstitutív jelátvitel fokozódás észlelhető [14, 24]. Ezt alátámasztja az ACC-ben leírt fokozott diffúz citoplazmatikus és nukleáris β -katenin festődés is, amely rossz prognózissal társul [25]. Ugyanakkor a CTNNB1 szomatikus mutációk jelenlétét mellékvesekéreg-rákban csak az esetek megközelítőleg egy harmadában sikerült kimutatni [21]. Az útvonal fiziológiás körülmények között szerepet játszik az embriogenezis során a mellékvesekéreg fejlődésében is. Ismert továbbá, hogy a fokozott aktivitású Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal mellékvesekéreg hyperplasiát és daganatképződést válthat ki [14, 25].

A BWS-re jellemző fokozott IGF-2 kifejeződés a sporadikus ACC-ben is általánosan megfigyelhető, az esetek 90%-ában kimutatható az expresszióbeli eltérés [16, 20]. Az IGF-2 befolyásolja a sejtnövekedést, a sejthalált, illetve jelfelfogó molekuláján keresztül a daganatképződést is [26]. A Wnt/ β -katenin útvonal mellett, az IGF-2 transzkripciós faktor is szerepet játszik a magzati mellékvesekéreg fejlődésében [27]. A transzkripciós faktoron kívül, annak receptoraként az IGF-1 receptor fokozott kifejeződése is megfigyelhető mellékvesekéreg-rákban [28]. Az útvonal jelentőségét aláhúzza az a tény is, hogy az IGF-1 és IGF-2 kötő fehérjék közül az insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) fokozott expresszióját is azonosították ACC-ben, sőt plazmakoncentrációja emelkedett az előrehaladott, metasztázissal járó esetekben. Prognosztikai markerként azonban a nem kellően magas szenzitivitás és specifitás miatt nem alkalmazható [29]. A paternális uniparentális diszómia talaján kialakuló BWS-ben leírt csökkent H19 és CDKN1C expressziót sporadikus rákokban is leírták [30]. Az említett gének a 11p15 locuson helyezkednek el, és esetükben a LOH a carcinomák körülbelül 70%-ában mutatható ki [16].

A MEN1 szindróma hátterében álló MEN1 gén mutációt az ACC-ben szenvedő betegek kevesebb, mint 10 %-ában tudták kimutatni [22]. Ezzel szemben a gént hordozó 11q13 régió allélvesztése a carcinomák 90%-ában azonosítható [20]. Fontos azonban kiemelni, hogy ACC-k esetén leggyakrabban a 11-es kromoszóma teljes hosszú karjának elvesztése jelentkezik, így más gének funkció kiesése is hozzájárulhat a mellékvesekéreg-rák kialakulásához [16].

Újgenerációs teljes genom, illetve exom szekvenálással is sikeresen azonosították az ACC-ben eddig is ismert mutációk és patogenetikai tényezők közül a TP53, a NF1, a MEN1, a CTNNB1, a CDKN2A, és a RB1 gén eltéréseit [22]. Ugyanakkor, leírták korábban még mellékvesekéreg-rákkal nem-asszociált új gének patogenetikai szerepét is. Ezek közül legfontosabbnak a Wnt/ β -katenin útvonal által ACC kialakításában szerepet játszó ZNRF3 gén tűnik [22]. A gén inaktiváló mutációi a β -katenin útvonal fokozott működését okozzák.

DNS metilációs vizsgálatokkal megállapították, hogy az ACC genomjára általánosan jellemző a hipometilált állapot, amely kromoszóma instabilitással és a genomikus imprinting zavarával jár együtt. Ezzel szemben a CpG-szigetek a tumor szuppresszor

gének promoter régiójában hipermetilált állapotban vannak, és az így kialakuló gátlás következtében kifejeződésük csökkent [22, 31].

További új megfigyelésként észlelték a DNS-replikációban kulcsszerepet játszó topoizomeráz-2A (TOP2-A) mRNS szinten fokozott expresszióját is [32]. A megfigyelés klinikailag is releváns lehet, tekintettel arra, hogy a topoizomeráz-gátló citosztatikumok közül az ACC kemoterápiájában alkalmazott doxorubicin és etopozid célmolekulája a TOP2-A. A sejtciklus fokozott aktivitása mellékvesekéreg-rákban ismert tény. Ezt bizonyítja a sejtciklus fokozott működését eredményező gének közül a egyes ciklinek és ciklindependens kinázok emelkedett expressziója is [20, 32].

Érdekes megfigyelés, hogy a szteroid bioszintézis enzimeit kódoló gének csökkent expresszióját azonosították carcinomákban az adenomákhoz viszonyítva, ami felveti a malignus transzformáció során bekövetkező dedifferenciáció lehetőségét [16, 33]. Ezzel ellenkezőleg az IGF-2 klaszterhez tartozó növekedési faktorok, illetve receptoraik relatíve fokozott kifejeződése figyelhető meg ACC-ben [33].

A rendelkezésre álló génexpressziós vizsgálati eredmények között a kis elemszámú betegcsoportok és az eltérő módszertan miatt nagyfokú diszkrepancia figyelhető meg. E problémák áthidalására és tisztázására munkacsoportunk az eddig közölt szakirodalmi és saját eredmények felhasználásával metaanalízist hajtott végre [34]. Ezek alapján három fő útvonalat sikerült azonosítani mellékvesekéreg-rák patogenezisében: 1. a sejtciklus károsodása 2. a retinoid jelátvitel érintettsége 3. a komplement rendszer és az antigén prezentáció megváltozott működése [34]. A retinoid jelátvitel zavarát munkacsoportunk tovább vizsgálta és *in vitro* humán NCI-H295R mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalon [35], illetve *in vivo* xenograft modellen is sikerrel bizonyította a 9-cisz retinsav tumorellesztő hatását [36].

1.1.1.3. Diagnózis

A mellékvesekéreg-rák preoperatív diagnosztikája három alappilléren nyugszik. Ezek közé tartoznak a lokális nyomási, illetve a hormontútermeléssel összefüggésben jelentkező klinikai tünetek, a laboratóriumi és a legfontosabb képalkotó vizsgálatok.

1.1.1.3.1. Hormonális aktivitás

A mellékvesekéreg-rák a legtöbb esetben hormonálisan aktív, így manifeszt klinikai szindrómákat hoz létre [5, 37]. Az aktív daganatok 50-80 %-ára a kortizol termelés jellemző. Szemben a jóindulatú daganatok okozta kortizoltútermeléssel, a Cushing-szindróma klasszikus tünetei mellékvesekéreg-rákban sokszor hiányoznak, mivel a gyors progresszió miatt a zsíreloszlási eltérések nem tudnak kialakulni. Számos esetben súlyos diabetes mellitus, izomgyengeség és hypokalaemia formájában jelentkeznek. A hypokalaemia hátterében a jelentős kortizoltútermelés aldosteronszerű hatása áll. Az esetek egy részében androgén tútermelés jelentkezik, ami nőkben férfias kopaszodással, hirsutismussal, virilizációval és szexuális diszfunkcióval társul. Az ösztrogén termelő ACC-k talaján kialakult feminizáció férfiakban nagyon ritkán, az esetek 1-3 %-ában alakul ki. Ugyancsak ritkaságnak számít az ACC-hez társuló primer hyperaldosteronizmus, melynek klasszikus tünetei a magas vérnyomás normál vagy alacsony kálium szint mellett [38]. Az esetek 30%-ában az ACC aspecifikus, lokális nyomási tüneteket okoz. Ezek közé tartoznak a háti, hasi, deréktáji fájdalom, a teltségérzet és a hányinger [37]. Fontos kiemelni, hogy a vizelet korszerű szteroid metabolomikai vizsgálatai kimutatták, hogy még a klinikailag inaktívnak látszó carcinomák is az esetek döntő többségében termelnek szteroid hormonokat vagy azok előalakjait [39, 40]. A hormonális aktivitás kivizsgálása ACC gyanúja esetén Európában a European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) által 2005-ben megfogalmazott ajánlás alapján történik [14]. A széleskörű laborvizsgálatok magukban foglalják a basalis kortizol, adrenokortikotropin, dehidroepiandrosteron-szulfát, 17-hidroxi-progeszteron, androsztendion, tesztoszteron, ösztradiol meghatározását, továbbá a kis dózisú dexametazon teszt utáni kortizol szint illetve a 24 órás gyűjtött vizelet

szabad kortizol koncentrációjának megállapítását [14]. A mineralokortikoid túltermelés gyanúja esetén aldosteron és renin meghatározás történik, illetve pheochromocytoma kizárása céljából metanefrin és normetanefrin mérés is szükségessé válhat.

1.1.1.3.2. Képalkotó vizsgálatok

A klinikai gyanú megerősítéséhez elsőként választandó modern képalkotási modalitás a CT vizsgálat. A daganat mérete és a denzitás értéke jelentős diagnosztikai relevanciával rendelkezik. A tumor méretének növekedésével-különösen a 4 cm átmérőt elérő daganatoknál- a malignitás valószínűsége fokozódik [41]. Az 1-4 cm átmérőjű daganatok diagnosztikai kihívást okoznak. Az ACA és ACC elkülönítését segítheti, hogy a carcinoma általában szabálytalan alakú, inhomogén szerkezetű, centrális necroticus és haemorrhagiás területeket tartalmaz, illetve meszesedés is megfigyelhető [9]. A carcinoma ezen kívül lokális szövetekbe, erekbe, esetenként a vena cava inferiorba is terjedhet. Natív CT esetén további fontos paraméter a denzitás, amelyet Hounsfield unit (HU) egységben fejeznek ki. Adenomára a magas zsírtartalom miatt ≤ 10 HU jellemző [5]. Amennyiben ennél magasabb HU érték adódik, kontrasztanyag adása indokolt, ami kiegészíthető késleltetett kontrasztanyag-kimosódási vizsgálattal is. Előbbi esetén kifejezettebbé válhatnak a bevérzések, a necrosisok és az inhomogenitás. Carcinomára fokozottabb kontrasztanyag halmozás és csökkent leadás jellemző. Ha a kimosódás 50%-nál alacsonyabb, illetve 10-15. percben készült CT felvételeken a denzitás eléri a 35 HU egységet, a malignitás nagymértékben valószínű [42]. A CT-nek továbbá a stádium meghatározásban is jelentős szerepe van a távoli áttétek igazolása révén [43].

MRI vizsgálattal az ACC jellemzően inhomogén szerkezetet mutat. T1-súlyozott felvételeken a májhoz képest hipointenzív, T2-súlyozás esetén pedig hyperintenzív képletként ábrázolódik. Kémiai eltolódást (chemical shift) vizsgáló MRI felvételeken ACC-re a heterogén, ACA-ra a homogén jelvesztés jellemző [42]. Az MRI-vel történő képalkotás előnye, hogy nem jár sugárterheléssel, illetve a környező szervekbe, erekbe történő invázió jobban megítélhető, mint CT-vel [42, 44].

A diagnózis felállításában a ^{18}F -fluorodeoxiglükóz pozitronemissziós tomográfia/komputertomográfia (FDG PET/CT) is szerepet játszhat. A módszer alkalmazásával az ACC a májnál intenzívebb FDG-felvételt mutat. A mellékvese májhoz viszonyított nyomjelző ágens felvételének mértékével határozható meg a standardized uptake value (SUV) érték. A SUV ACA esetén $< 1,45$, míg ACC esetén $> 1,45$ értéket ad és 100%-os szenzitivitással és 88%-os specificitással különíti el a két entitást [45].

Az utóbbi időben MR-spektroszkópia és ^{11}C -MTO (11-es szénizotóppal jelölt metomidát) PET/CT módszerével is történtek vizsgálatok. A metomidát a mellékvesekéreg eredet megerősítésére is alkalmas lehet, mivel specifikusan képes kötődni a szteroid szintézisben szerepet játszó enzimekhez. A módszerek klinikai gyakorlatba történő bevezetéséhez azonban további nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek [46].

A mellékvesekéreg adenoma és carcinoma képalkotói jellegzetességeit a **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat: A mellékvesekéreg adenoma és carcinoma jellemzői a különböző képalkotói modalitások alkalmazása esetén

SUV: standardized uptake value FDG PET/CT: ¹⁸F-fluorodeoxiglükóz pozitronemissziós tomográfia/ komputertomográfia

	ACC	ACA
Átmérő	> 4 cm	< 4 cm
Necrosis	Jellemző	Nem jellemző
Bevérzés	Jellemző	Nem jellemző
Meszesedés	Jellemző	Nem jellemző
CT denzitás	Heterogén, >10 HU	Homogén, <10 HU
T1-súlyozás (májhoz viszonyítva)	Hipointenzív	-
T2-súlyozás (májhoz viszonyítva)	Hiperintenzív	-
Kémiai eltolódás jelensége MRI felvételen	Heterogén jelcsökkenés	Homogén jelcsökkenés
Kontrasztanyag halmozás	Heterogén	Homogén
Kontrasztanyag kimosódás	lassú, < 60 %	gyors, > 60 %
SUV FDG PET/CT (májhoz viszonyítva)	fokozott, > 1,45	csökkent < 1,45

1.1.1.3.3. Szövettani vizsgálat

A mellékvesekéreg daganatok szövettani vizsgálata nagy felkészültséget igényel, és jelenleg is kihívást jelentő problémát okoz [14]. Első lépésként a tumor mellékvesekéreg eredetét kell bizonyítani. A tanulmányok alapján erre legalkalmasabb markernek a SF-1 fehérje bizonyult, melynek jelenlétét immunhisztokémiai vizsgálattal lehet kimutatni [47]. A dignitás meghatározásához napjainkban is a Weiss-score rendszert használjuk [48, 49]. Ebben a kritériumrendszerben az alábbi 9 szempontot vizsgálják: magas mitotikus aktivitás, atípusos mitózis, magas nukleáris „grade”, világos citoplazmájú sejtek alacsony aránya, necrosis, diffúz tumor architektúra, tok áttörése, sinusoidális és vénás invázió. Minden egyes kritérium jelenléte 1 pontot ér, így állítható fel a vizsgált daganatra jellemző Weiss-érték, amely 0-9 pont között lehet.

ACC diagnózisa felállítható, ha az összpontszám 3, vagy több. 0-2 pontszám között bizonyos megkötések mellett általában ACA a diagnózis. A módszer hátránya a nem megfelelő reprodukálhatóság. Ennek hátterében a kritériumok nagyfokú szubjektív megítélése, illetve a vizsgáló személy tapasztalatától függő végső érték áll [50]. A Weiss-score mellett leginkább immunhisztokémiai módszerrel meghatározott Ki-67 proliferációs index használható fel a diagnózis megállapításához. ACC esetén a Ki-67 index általában 5%-nál nagyobb [5]. A meghatározás a várható prognózis megállapításához is nélkülözhetetlen, ugyanis kiváló markere mind a kiújulásnak, mind az átlagos túlélésnek [15, 51]. Proliferációs indexként alkalmazható még továbbá a mitózisok száma. Amennyiben több, mint 20 mitózis azonosítható 50 látóterenként, akkor „high grade ACC”-ről beszélünk, ami rossz prognózissal társul. Ezzel szemben, ha a mitózisok száma kevesebb, mint 20/50 High power field (HPF), akkor „low grade ACC” áll fenn, amely jobb túléléssel társul [52].

A szövettani vizsgálat nehézségei miatt, valamint a daganat esetleges toksérülése nyomán jelentkező propagációra tekintettel a mellékvesekéreg-rák diagnózisában a biopsziás mintavétel nem ajánlott. Mellékvese biopsziát csak kivételes esetben javasolunk, amikor a szövettani vizsgálat az észlelt mellékvese terime kezelését alapvetően befolyásolja, pl. mellékvese lymphoma gyanúja esetén.

1.1.1.4. Stádiumbeosztás és prognózis

A malignus daganatok prognózisának megítéléséhez elengedhetetlen az objektív kritériumokon alapuló stádiumbeosztás meghatározása. A rosszindulatú daganatok esetén általánosan elterjedt TNM (T: primer tumor, N: regionális nyirokcsomó érintettség, M: távoli metasztázis) beosztást alkalmazzuk ACC esetében is. Kezdetben a 2003-ban megalkotott UICC/WHO (Union for International Cancer Control/ World Health Organization) klasszifikáció terjedt el (**2. táblázat**). A beosztásnak azonban jelentős hátránya volt, hogy a II-es és III-as stádiumba sorolt betegeknél a túlélések között nem volt szignifikáns mértékű eltérés. Emiatt vált szükségessé a prognózist jobban becselő rendszer megalkotása. Jelenleg az ENSAT által 2009-ben meghatározott kritériumrendszer alkalmazását javasolják ACC esetén [53] (**2. táblázat**). Lokális ACC-

k közül I-es stádiumba tartozóak az 5 cm-nél kisebb daganatok, míg II-es stádiumba sorolandóak az ennél nagyobb daganatok. Amennyiben a rák infiltrálja a környező szöveteket (pl. paraadrenalis zsírszövet, szomszédos szervek), regionális nyirokcsomó érintettség illetve daganat trombus a vena cava inferiorban és/vagy a vesevénákban fennáll, akkor az ACC a III. stádiumba sorolandó. IV. stádium esetén távoli áttét igazolható. A leggyakoribb metasztázisok közé a máj, tüdő és csont áttétei tartoznak. A daganat felfedezésének időpontjakor leggyakrabban a II. stádium áll fenn (45%), ezt követi a III. (27%) és a IV. stádium (24%). Sajnos az esetek alig 14%-ban történik meg a diagnózis felállítása I. stádiumban. Az egyes stádiumok 5 éves túlélése jelenleg az alábbiak szerint várható: I. stádium 95%, II. stádium: 61%, III. stádium 50%, IV. stádium 13% [5, 53, 54]. Az ENSAT beosztás prognosztikai hatékonyságát több vizsgálat megerősítette [51, 54].

2. táblázat: Az adrenocorticalis carcinoma TNM beosztása az UICC és ENSAT által meghatározott kritériumok alapján.

T1: primer tumorátmérő ≤ 5 cm, T2: primer tumorátmérő ≥ 5 cm, T3: tumor terjedés szomszédos szövetekbe, T4: tumor terjedés távoli szervekbe, NO: nincs nyirokcsomó érintettség, N1: van nyirokcsomó érintettség, MO: nincs távoli áttét, M1: van távoli áttét

	Stádium beosztás	
	UICC/WHO	ENSAT
Stádium I	T1, NO, MO	T1, NO, MO
Stádium II	T2, NO, MO	T2, NO, MO
Stádium III	T1-T2, N1, MO	T1-T2, N1, MO
	T3, NO, MO	T3-T4, N0, MO
Stádium IV	T1-4, NO-1, M1	T1-T4, NO-N1, M1
	T3-4, N1, MO	
	T4, NO, MO	

1.1.1.5. Terápia és utánkövetés

1.1.1.5.1. Lokális ACC

A mellékvesekéreg-rák kezelésében máig egyetlen kuratív beavatkozás a tumor sebészeti eltávolítása. A prognózist döntő mértékben befolyásolja a műtét sikeressége. Amennyiben a tumor rezekciója teljes, RO rezekcióról van szó, amely a legjobb prognózissal jár együtt. Amennyiben mikroszkopikus (R1) vagy makroszkopikus (Rx) tumorszövet marad hátra, az nagymértékben rontja a várható túlélést. Nemzetközi ajánlásként az adrenalectomiát centrumokban, tapasztalt sebészek által célszerű elvégezni [55]. A nagy elemszámú prospektív összehasonlító vizsgálatok hiánya miatt egyértelműen elfogadott ajánlás nem áll rendelkezésre, hogy a hagyományos, nyitott vagy a laparaszko-pos technikával elvégzett műtét társul-e jobb prognózissal. Általánosságban elmondható, hogy előrehaladott stádiumú daganatban szenvedő betegnél a nyitott adrenalectomia alkalmazásának esetén ritkábban észlelték a kiújulás és carcinomatosis peritonei jelentését [56]. Kisebb, lokális daganat fennállásakor azonban a laparaszko-pos eltávolítás is mérlegelhető [9].

A tumor eltávolítása után adjuváns terápiával egészíthető ki a kezelés. Jelenleg két módszerrel (gyógyszerrel és besugárzás által) csökkenthetjük az ACC lokális recidívájának valószínűségét.

A gyógyszeres kezelés egyetlen ágensre, az adrenolitikus hatású mitotánra szorítkozik. A mitotán pontos hatásmechanizmusát nem ismerjük, de az eddigi vizsgálatok alapján hatásában szerepet játszik a mitokondriális légzési lánc gátlása, membránkárosodást idéz elő, illetve a programozott sejthalált is aktiválhatja [57, 58]. Újabb eredmények alapján a mitotán fő célpontja a SOAT1 fehérje lehet. A mitotán a SOAT1 enzim gátlásán keresztül a toxikus lipidek (koleszterin, oxysterol és zsírsavak) felhalmozódása révén az endoplazmatikus reticulum stressz indukálásával fejtheti ki hatását [59]. A szer terápiás ablaka szűk és jelentős mellékhatásokat okozhat. A fellépő hányinger, hányás, emésztőrendszeri panaszok, vertigo és egyéb központi idegrendszeri zavarok miatt a betegek egy része nem képes tolerálni a mitotán terápiát [57].

Az adjuváns terápia második lehetősége a tumorágy külső besugárzása. Alkalmazását leginkább inkomplett sebészeti eltávolítás után javasolják [60]. Egyes eredmények alapján sikeresen képes csökkenteni a lokális recídív esélyét, azonban az átlagos túlélési időt nem emeli szignifikáns mértékben [61, 62]. Reménykeltő *in vitro* kísérletek alapján a szimultán alkalmazott besugárzás és mitotán terápia szinergista módon képes csökkenteni a tumorsejtek növekedését [63].

1.1.1.5.2. Kiterjedt, metasztatikus ACC

Előrehaladott, metasztatikus ACC esetén tumortömeg-csökkentő, úgynevezett debulking műtét indokolt esetben kivitelezhető. Mindazonáltal alapos mérlegelés tárgyát kell képezze a lehetséges előny-hátrány megítélése. A beteg általános állapotának, a műtét által elérhető hosszabb túlélési időnek vagy jobb életminőségnek kell a döntő szempontnak lennie [63].

A metasztatikus ACC gyógyszeres terápiája sajnálatos módon csekély javulást eredményez a betegség lefolyásában. Több tanulmány is foglalkozott a szisztémás tumorelles terápia lehetőségeivel. Közülük eddig a legjobb eredményt a progresszió mentes és átlagos túlélésre az etopozid-doxorubicin-ciszplatin (EDP) hármas kombinációjú kemoterápia és a mitotán (M) együttes adása érte el [64]. Az M-EDP kezelésre nem reagáló betegek esetén másodvonalbeli terápiaként a gemcitabin-capecitabin kombinációs kezelés az esetek kis részében stabilizálhatja a betegséget [65].

Előrehaladott tumor stádiumnál palliatív céllal a metasztázisok illetve a tumor méretének csökkentésére loko-regionális beavatkozásként rádiófrekvenciás abláció vagy transzarteriális kemoembolizáció végezhető el abban az esetben, ha a műtét kontraindikált. A módszerek hatékonyságát klinikai vizsgálatokban eddig még nem elemezték [9].

Az ACC kezelésében a molekulárisan célzott biológiai terápiás szerek sajnos nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. Az erlotinib és gemcitabin kettős kombinációja érdemben nem csökkentette az epidermális növekedési faktor receptor expresszióját [66]. Hasonlóan a humanizált vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

ellenes monoklonális ellenanyag, a bevacizumab sem mutatott érdemi eredményt [67]. A multitirozin-kináz inhibitorok családjába tartozó sorafenib nem [68], míg a sunitinib csekély mértékben stabilizálta a betegséget [69]. Az IGF-1R-t gátló kismolekulasúlyú linsitinib és a receptor ellenes antitestek közé tartozó cixutumumab monoterápia teljes mértékben hatástalannak bizonyult [70, 71], míg ha az utóbbi szert mTOR gátló temsirolimussal egészítették ki, akkor a betegek közel felében terápiás választ értek el [72].

1.1.1.5.3. Utánkövetés

A mellékvesekéreg-rákban szenvedő betegek utánkövetésének gyakoriságára vonatkozó egyértelmű ajánlással nem rendelkezünk. Tekintettel az ACC agresszív viselkedésére a kezdeti terápia után háromhavonta célszerű a beteget kontroll vizsgálatra visszarendelni. Ha recidíva 3 évig nem jelentkezik, akkor az utánkövetés félévente javasolt. Ötéves tünetmentesség után pedig 1-2 évente célszerű a teljeskörű kivizsgálást elvégezni. Ennek magában kell foglalnia a részletes fizikális vizsgálatot, a tumormarkerek és a szteroid panel meghatározását, a képalkotó vizsgálatok közül pedig a hasi és kismedencei, illetve mellkas CT-t is a restaging céljából [5, 9].

1.2. A mikroRNS-ek biológiája

1.2.1. Az RNS-interferencia jelensége

Az RNS interferencia jelenségét az 1990-es évek elején írták le [73]. Napoli és munkatársai petunia növénybe injektálták a sötét pigment képződésért felelős gént [74]. A virágok azonban a várt sötét szín ellenére fehérek vagy foltosak lettek. A jelenség magyarázatára 1998-ig kellett várni, amikor kettős szálú RNS molekulákat jutattak be *C.elegans*-ba és jelentős géncsendesítést figyeltek meg [75]. A csendesítés hátterében az állt, hogy a kettős szálú RNS rövid szakaszokra vágódott, és a komplementaritásnak megfelelően gátolta a mRNS-ek funkcióját. A jelenséget RNS interferenciának, míg a végrehajtóit rövid interferáló RNS-eknek nevezték el.

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) az RNS interferencia endogén közvetítői. Az első miRNS-t, a lin-4-et 1993-ban fedezték fel. A lin-4 a klasszikus útvonalon keresztül fejti ki hatását, vagyis a lin-14 gén 3' nem-átíródo régiójához (UTR-untranslated region) kötődve negatívan befolyásolja a lin-14 fehérje szintjét [76, 77]. A legfrissebb miRbase adatbázis alapján jelenleg 2693 érett, humán miRNS-t ismerünk (www.miRbase.org, Release 22, March 2018).

1.2.2. A miRNS-ek nevezéktana

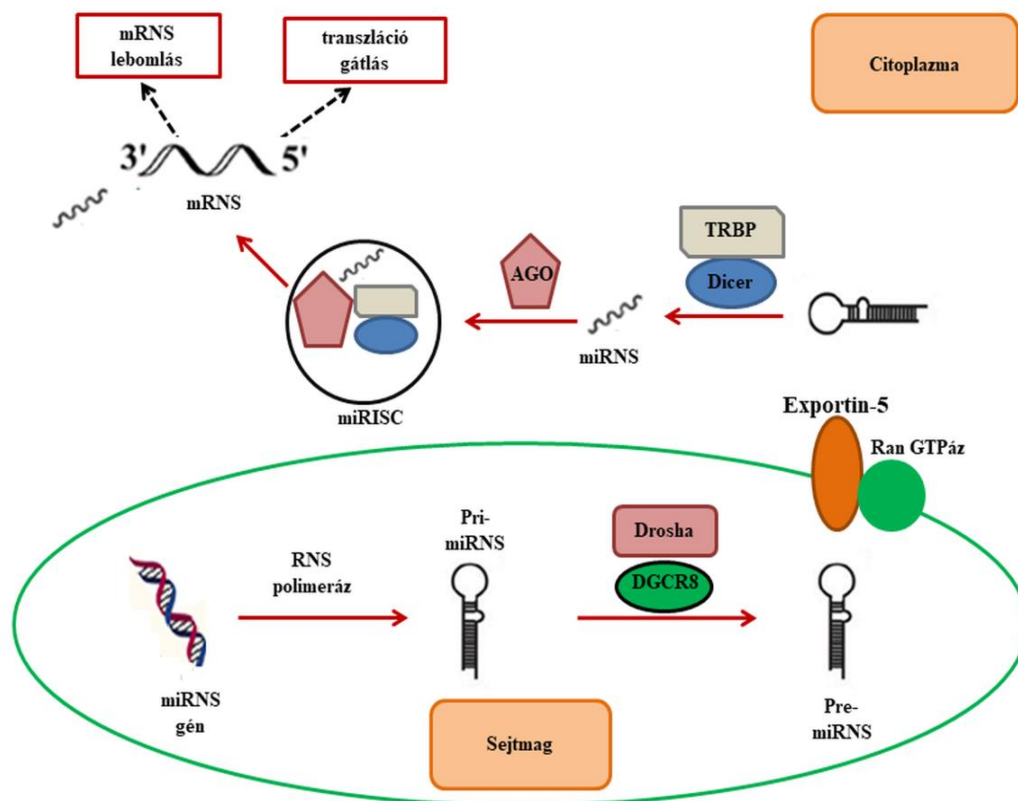
A miRNS-ek neve három fő részből tevődik össze. A név első tagja a miRNS származási fájára utal (pl.: hsa-H. sapiens, cel- *C. elegans*). A következő elem az összes miRNS esetében az általános használt miR rövidítés. Míg a név utolsó tagja egy sorszám. Fontos kiemelni, hogy egy sorszám csakis egy miRNS bázissorrendhez tartozik. Amennyiben két miRNS szekvenciája megegyezik, de a genom eltérő régiójából íródna át, akkor az első sorszám után kötőjellel egy újabb számot illesztenek hozzá (pl.: miR-7-1, miR-7-2). Abban az esetben, ha a szekvenciák között csak minimális (1 vagy 2) nukleotidban van eltérés, akkor a sorszám után folytatólagosan egy betűt adunk a névhez (miR-320a, miR-320b). Egyes prekursor-miRNS-eknél

mindkét szál funkcionálisan aktív maradhat. A kevésbé domináns, kisebb mértékben kifejeződő miRNS-t csillaggal jelölik (miR-56, miR-56*). Egy adott prekursor-miRNS kétféle módon is hasítódhat, ha a vágás az 5' véghez közelebbi akkor -5p végződést (miR-483-5p), míg ha a 3' véghez esik közelebb, akkor -3p jelölés alkalmazandó (miR-483-3p) [78, 79].

1.2.3. A miRNS-ek bioszintézise és hatásmechanizmusai

1.2.3.1. A miRNS-ek bioszintézise

A miRNS gének döntő többsége a nem-kódoló genomi régióban helyezkedik el, míg kisebb részük a fehérjekódoló gének exonjaiban vagy intronjaiban találhatóak [80, 81]. A legtöbb miRNS génjét az RNS polimeráz II enzim írja át, létrehozva az elsődleges miRNS-t (pri-miRNS) [82]. Az esetek kisebb részében a transzkripció az RNS polimeráz III enzim közreműködésével történik. Az érett, egyszálú miRNS kialakulása többféle módon is létrejöhet. Ezek közül a legismertebb és leggyakoribb az úgynevezett kanonikus útvonal (**1. ábra**). Ezen az útvonalon a kétszálú pri-miRNS-t a mikroprocesszor komplex hasítja a sejtmagban. A komplex a pri-miRNS-t felismerő nukleáris protein DiGeorge Syndrome Critical Region 8-ből (DGCR8) és a miRNS-t hasító Drosha enzimből áll [83, 84]. Az így létrejövő prekursor miRNS-t (pre-miRNS) az Exportin-5 szállítja aktív transzporttal a sejtmagból a citoplazmába. Az energiaigényes folyamatot a Ran GTP-áz fehérjék biztosítják [85, 86]. A citoplazmába kerülő pre-miRNS-t az RNáz III endoribonukleáz enzimsoporthoz tartozó Dicer hasítja érett, egyszálú 19-25 nukleotid hosszúságú miRNS-sé [87]. A miRNS-mediált gén szabályozás kulcsszereplője az RNS indukált csendesítő komplex (miRNA/RNA induced silencing complex, miRISC/RISC) kialakulása. Ez a komplex az érett, egyszálú miRNS-ből, a Dicerből, különféle Argonaute (AGO) fehérjékből és a TRBP (TAR RNA binding protein) RNS-kötő fehérjéből áll [88, 89]. Az AGO fehérjék központi szerepet töltenek be a RISC-ben. Közülük leggyakrabban AGO2 épül be, amely katalitikus aktivitással rendelkezik [90]. A család többi tagja a transzláció gátlásán keresztül fejti ki a hatását [90, 91].



1. ábra: A miRNS-ek képződése és érési folyamata a kanonikus útvonalon

A komplex érési folyamat részletes leírása a szövegben olvasható. *miRNS: mikroRNS, pri-miRNS: primer-miRNS, DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8, TRBP: TAR RNA binding protein, Ago: Argonaute fehérjék, miRISC: miRNS indukált csendesítő komplex, mRNS: hírvivő RNS, 3'UTR: 3' nem transzlálódó régió*

1.2.3.2. A miRNS-ek génexpresszióra kifejtett biológiai hatásai

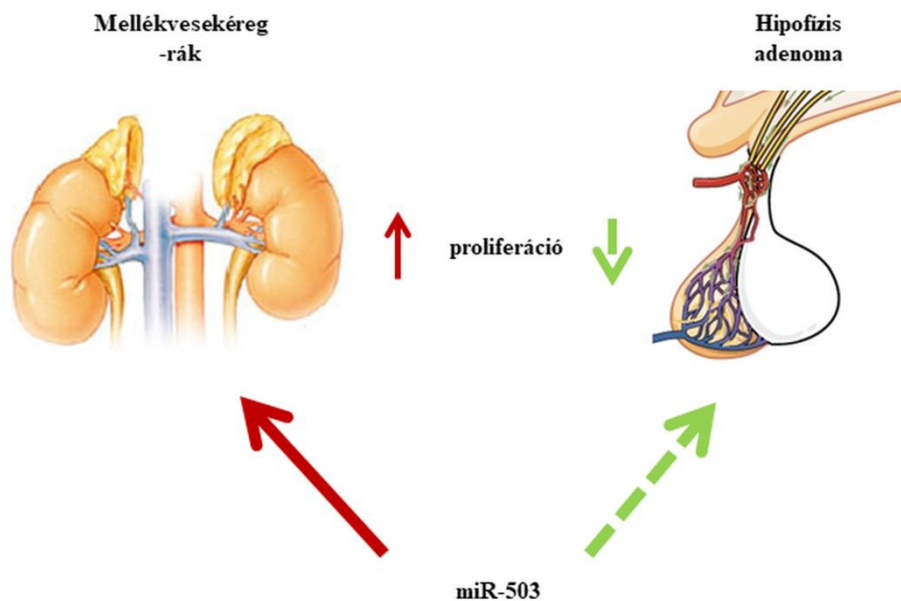
A miRNS-ek rövid, érett formájukban 19-25 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló RNS molekulák. A génexpressziót mind a sejtmagon belül, transzkripcionálisan, mind a citoplazmában poszt-transzkripcionálisan befolyásolják [92]. Az RNS-interferencia endogén mediátoraiként a DNS szekvencia megváltoztatása nélkül fejtik ki hatásukat [93], így az epigenetikai szabályozó rendszer fontos elemei [94, 95]. Az emberi gének 30-60 %-a állhat miRNS szabályozás alatt [96, 97].

A miRNS-ek kifejezetten konzervatív molekulák. Nagyfokú hasonlóságot mutatnak a fejlődés-biológiailag olyan távoli fajok között is mint a férgek, rovarok vagy emlősök [93]. Az eukarióták birodalmán belül a miRNS-ek a génexpresszióra gyakorolt hatásukat hasonló módon, főként poszt-transzkripcionális szinten fejtik ki [93, 98, 99]. Egyes vizsgálati eredmények alapján a génexpressziót befolyásoló hatásukat filogenetikailag távoli fajok között (akár az öt királyságon belül) is kifejthetik [100, 101].

A miRNS-ek legjellemzőbb biológiai hatása a sejt plazmájában lejátszódó génexpresszió poszt-transzkripcionális befolyásolása. Ennek létrejöttéhez a miRNS-nek fel kell ismernie és kapcsolódnia kell a célpont mRNS-hez. A miRNS leggyakrabban a mRNS 3'UTR-hoz kötődik [102], ritkábban az 5'-UTR, illetve a kódoló régióhoz [103]. A kapcsolódásban a RISC-ben található miRNS 5' végén található első 8 nukleotid (leggyakrabban 2.-tól és 7.-ig) vesz részt [104].

A miRNS-ek mRNS célpont predikciója első lépésben *in silico*, bioinformatikai módszerrel történik [105]. Ezzel a megközelítéssel rengeteg potenciális célpont nyerhető, azonban ezek lehetséges biológiai relevanciáját genetikai és biokémiai módszerekkel szükséges megerősíteni [106, 107]. Egyetlen miRNS célpontjának és transzkripciós hatásának vizsgálatához legjobban a luciferáz enzim használata terjedt el, ahol a fényreakció intenzitásából lehet következtetni az expresszió változására [108]. Több célpont elemzéséhez izotóppal jelölt aminosavakat vizsgálnak tömegspektrométerrel [109, 110].

A miRNS-ek működésére jellemző a pleiotrópia, mivel egy miRNS-nek akár több száz mRNA célpontja is lehet [111]. Továbbá szinergizmus, illetve antagonizmus is karakterisztikus, tekintettel arra, hogy egy mRNA expresszióját több (akár százas nagyságrendű) miRNS is befolyásolhatja [112]. A miRNS-ek szövetspecifikus módon fejeződnek ki, továbbá különféle szövetekben eltérő hatással rendelkezhetnek. Erre példa a miR-503, amely ACC-ben felül-, míg hypophysis daganatokban alulexpresszálódik [113, 114] (2. ábra).



2. ábra: A miR-503 szövetspecifikus hatása

Folyamatos piros nyíl fokozott expressziót, míg szaggatott zöld nyíl csökkent expressziót jelent.

A miRNS-ek a génexpressziót döntően negatív módon befolyásolják. E hatásukat főként poszt-transzkripcionális szinten fejtik ki. A gátlás hatásmechanizmusa a mRNA és a miRNS közötti komplementaritástól függ. Tökéletes illeszkedés esetén a RISC-ben elhelyezkedő AGO2 hasítja a mRNA-t, amit annak degradációja követ. Ez a fajta hatás növényekben jellemző, az állatok között ugyanis ritka a teljes mértékű

komplementaritás [115]. Parciális egyezés esetén transzláció gátlás alakul ki. A gátlás kifejtésének három módozata ismert. A pretranszlációs folyamat során a miRNS-ek epigenetikai szabályozó enzimek működését befolyásolják. Ezek közé tartoznak többek között a DNS metiltranszferázok, vagy a hiszton deacetilázok [95, 116]. Ennél fontosabb folyamat a kotranszlációs csendesítés. A csendesítés létrejöhet azáltal, hogy a transzláció folyamán az exoribonukleázokkal szemben védtelen mRNS alakul ki, amit a mRNS degradációja követ [117, 118]. Ezenkívül a transzláció iniciáló faktor gátlásán keresztül zárt hurkú mRNS képződhet, ami a hatékony transzlációt lehetetlenné teszi [118, 119]. A posztiniciációs folyamat során az AGO fehérje gátolja a nagy riboszomális alegységet, így annak leválása következik be, amely korai mRNS láncterminációt okozhat [120], illetve a citoplazmatikus enzimek aktiválása révén mRNS bomlás is bekövetkezhet [121]. Összefoglalásként elmondható, hogy a fent ismertetett összetett mechanizmusok által a mRNS kifejeződésének csökkenése degradáción vagy a transzláció gátlásán keresztül következik be.

Az eddig részletezett citoplazmatikus negatív hatásokon kívül a miRNS-ek a sejtmagon belül is kifejthetik a génexpressziót befolyásoló hatásukat [122]. Bizonyos esetekben a miRNS-ek génexpressziót fokozó hatását is leírták már a szakirodalomban [95, 123]. Erre példa a miR-373, amely a E-cadherin promoter régiójához kötődésével indukálja az RNS polimeráz aktivitását [124]. A ciklin B1 transzkripcióját pedig a miR-744 és miR-1186 képes fokozni azáltal, hogy a gén promoter régiójához kapcsolódnak [125]. További érdekes megfigyelés, hogy az AGO2 a mRNS expresszióját fokozni is képes abban az esetben, ha a célpont mRNS nem rendelkezik polyadenin farokkal [126].

A miRNS-ek széleskörű élettani hatásokkal rendelkeznek. Befolyásolják az alapvető sejtbiológiai folyamatok közül a sejtciklust, a sejt differenciációt és az apoptosist is [127, 128]. Kiemelt szerepet töltenek be az embrio-, osteo-, adipo- [128], myo-[129], és neurogenesisben [130]. Szabályozó funkciójukat a hormontermelésben is leírták. Erre a funkcióra példa a miR-375, amely gátolja a CRF, az ACTH és a POMC szekrécióját is, ezáltal csökkentve a perifériás hormonok szintjét is [131], ezenkívül a vércukor szabályozta inzulinszekrécióban is fontos regulátor szerepet tölt be [132]. A miRNS-ek az immunrendszer effektív működésében is nélkülözhetetlenek. A veleszületett és a szerzett immunválasz kialakítását is befolyásolják [128, 133].

Az élettani folyamatok szabályozásán kívül számos betegség kialakításában is részt vesznek. Megváltozott kifejeződésük ismert többek között különféle fertőzésekben, gyulladásos, autoimmun megbetegedésekben is [133]. Daganatok széles skáláján írták le abnormális expressziójukat [134, 135]. A tumorok kialakításában betöltött szerepük alapján - a klasszikus onkogén illetve tumor szuppresszor génekhez hasonlóan megkülönböztetünk onkogén és tumor szuppresszor miRNS-eket [136]. Azon miRNS-eket, amelyek a proliferációt, az angiogenezist, illetve a tumorsejtek invázióját elősegítik oncomiR-eknek nevezzük. Szintjük a rosszindulatú daganatokban általában fokozott, és a tumor szuppresszor mRNS-ek expresszióját csökkentik. Ezzel ellentétben a tumor szuppresszor miRNS-ek az apoptosison és a differenciáción keresztül a daganatok kialakulását gátolják. Malignus tumorokban szintjük jellemzően csökkent, így az általuk szabályzott onkogén mRNS-ek expressziója fokozott. Tekintettel a miRNS-ek szövetspecifikus hatásaira, fontos megemlíteni, hogy egy adott miRNS különböző szövetekben betölthet tumor szuppresszor és onkogén szerepet is.

1.2.4. Az extracelluláris miRNS-ek

Az extracelluláris miRNS-eket először 2008-ban írták le [137]. Ebben a kutatásban várandós nők vérplazmájából tudtak kimutatni placenta-eredetű miRNS-eket, amelyek a terhesség után kimutathatatlanul váltak a keringésből [137]. Ez a felfedezés vezetett ahhoz a hipotézishez, hogy az extracelluláris miRNS-ek az egyén fiziológiai állapotát tükrözhetik. Ezzel egy időben különböző kutatócsoportok daganatos betegek mintáiból is sikerrel izoláltak miRNS-t [138, 139]. A további vizsgálatok megerősítették, hogy majdnem minden testváladékból kimutathatóak a miRNS-ek. Így jelenlétüket leírták többek között nyálban, vizeletben, székletben, anyatejben, könnyben, agy-gerincvelői folyadékban, spermában, vaginális váladékban, peritonealis és pleuralis folyadékban is [140]. A vérben található miRNS-eket keringő miRNS-eknek nevezzük. Az extracelluláris miRNS-ek egy része (vér, vizelet, nyál) viszonylag könnyen hozzáférhető és nyerhető a páciensről. Ezáltal minimálisan invazív biomarkerek lehetnek a jövőben különböző betegségek, többek között daganatos megbetegedések diagnózisának felállítására, illetve prognózisuk megállapítására [139, 141]. Az

extracelluláris miRNS-ek egyes vizsgálati eredmények alapján képesek másik sejtbe bejutni [142, 143]. Ezáltal hormonszerű biológiai aktivitással is rendelkezhetnek. A sejtek közötti kommunikáció révén akár távoli szövetek génexpresszióját is befolyásolhatják [144, 145]. E hatásuk bizonyítására azonban még nem állnak rendelkezésre egyértelmű vizsgálati eredmények [126, 146]. Ugyanakkor egyes kutatócsoportok a sejten kívüli miRNS-eket biológiailag nem funkcionáló, a sejthalál által passzívan szivárgó mellékterméknek tekintik.

A testfolyadékokban jelenlévő extracelluláris miRNS-ek rendkívül stabil molekulák, ellenállóak a külső behatásokkal szemben [138, 147, 148]. Huzamosabb ideig tolerálják a szobahőmérsékletet, illetve még a forralást is [149]. Rezisztensek az alacsony és magas pH szinttel szemben is [139]. Hosszú, akár évekig tartó tárolás (-80 °C-on), illetve többszörös fagyasztási vagy felolvasztási ciklusok sem csökkentik érdemben a szintjüket [150, 151].

Jelenlegi tudásunk alapján a miRNS-ek sejtből való kijutása három fő módon történhet meg. Elsőként a sejtet ért károsodás (sejthalál vagy gyulladás) miatti passzív szivárgás által. Emellett aktív szekrécióval extracelluláris vezikulákba (EV) szecernálódhatnak [151], illetve AGO fehérjékhez vagy high density lipoproteinhez (HDL) kötődve keringhetnek az extracelluláris térben [143, 152].

Az extracelluláris miRNS-ek döntő többsége ribonukleo-proteinekkel alkotott komplexekben találhatóak [153]. A keringésben található miRNS-ek 90-95%-a AGO (leggyakrabban AGO2) ribonukleo-proteinekhez kötődik [151, 152]. Kisebb részben a miRNS-ek extracelluláris vezikulákban fordulnak elő (mikrovezikula, exoszóma, apoptotikus test) [151] vagy lipoproteinekhez, mint a HDL kapcsolódva [143]. Ezek biológiai jelentősége ugyanakkor jóval nagyobb, mint az AGO2-höz kötött miRNS-ekének, hiszen az EV-k és HDL-hez kötött miRNS-ek igazoltan biológiai hatást közvetíthetnek. A ribonukleo-proteinhez társult miRNS-eket egyes szerzők sejtszételéséből származó törmeléknek tekintik.

1.3. Az extracelluláris vezikulák

A sejt által szecernált membránnal határolt részecskéket összefoglalóan EV-knak nevezzük. További csoportosítási mód a szecernáló sejt típusa vagy a biogenezis útvonala alapján lehetséges. A szakirodalomban inkább az utóbbi verzió terjedt el, így munkám során én is ezeket ismertetem. Az EV-k a kialakulási módjuk alapján három nagy csoportba sorolhatóak (mikrovezikula, exoszóma, apoptotikus test) (**3. ábra**).

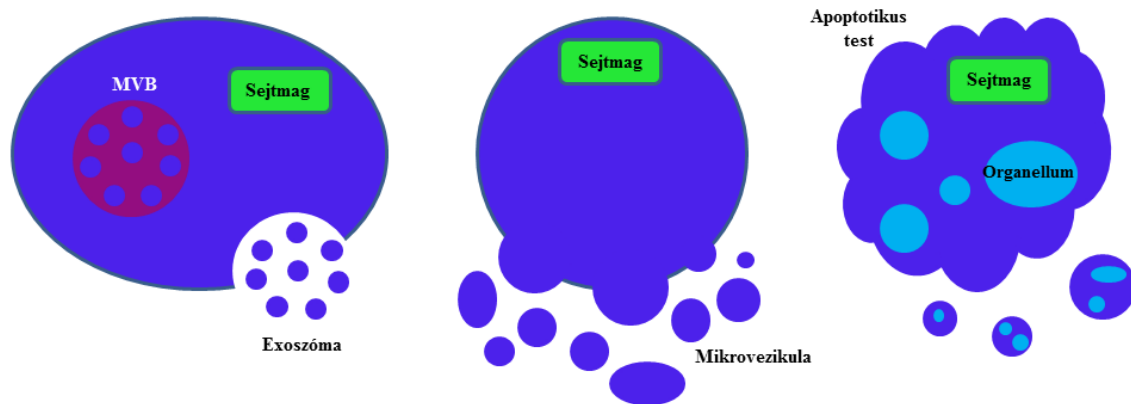
Az exoszómák foszfolipid kettősréteggel határolt EV-k. Az endo-lizoszomális útvonalon alakulnak ki azáltal, hogy a multivezikuláris test (multivesicular body-MVB) és a plazmamembrán fuzionál egymással [154]. Az endoszómák komplex érési folyamata során jönnek létre a MVB-k. A MVB-ek a biomolekulák sejten belüli transzportjában játszanak alapvető szerepet. A molekulák egy részét az endoszómák a lizoszómákba továbbítják, ahol lebontásra kerülnek, másik részüket a Golgi-apparátusba juttatják vissza újbóli felhasználás céljából, míg a harmadik részük a miRNS-ekhez hasonlóan a plazmamembránon keresztül kiválasztódásra kerülnek. Az exoszómák kiválasztódása konstitutív és indukálható módon is létrejöhet [155]. Az exoszómákat döntő többségben az immunsejtek (dendritikus sejt, T-sejt, B-sejt, macrofágok) és a tumorsejtek szecernálnak. Átmérőjük mérettartománya általában 40-120 nm közé esik. Hatásukat a recipiens sejten három fő módon fejthetik ki: 1. közvetlen kapcsolat kialakítása az exoszómák felszíni markerei és a sejt között, 2. az exoszómák endocitózisa által való bejutás a sejtbe, 3. a vezikula és a sejtmembrán fúziója általi való bejutás a sejtbe. Ezen mechanizmusok révén az exoszómák a miRNS-ek és a mRNS-ek horizontális szállításában is részt vesznek [156]. Az újabb tanulmányok alapján az exoszómák alapvető élettani funkciója az antigénprezentálás és az immunrendszer működésének befolyásolása. [155]. Felszínükön különféle markerek fejeződnek ki, többek között a tetraspaninok (CD9, CD63, CD81) és az annexin V [157]. Az exoszómák fehérjéken, lipideken és egyéb nukleinsavakon kívül majdnem minden típusú RNS-molekulát is tartalmaznak. Az exoszómákon belül kimutathatóak miRNS-eken kívül, a mRNS-ek, a riboszómális RNS-ek, a transzfer RNS-ek, a kis nukleáris RNS-ek és hosszú, nem kódoló RNS-ek is [158]. A donor sejt miRNS mintázata jelentős mértékben eltérhet az exoszomáétól, ami felveti a szelektív kiválasztódás valószínűségét is [146, 159, 160]. Az exoszómák egy adott miRNS-t relatíve alacsony

kópia számban tartalmaznak [161], azonban ez a mennyiség is elegendő lehet a biológiai hatás kifejtéséhez tekintettel arra, hogy a mRNS-hez specifikusan képes kötődni [146, 162].

A mikrovezikulák (MV) a plazmamembrán kifelé bimbózása és leválása által alakulnak ki. Jellemző felszíni markereik közé tartozik a szöveti faktor és a donorsejt eredetű markerek (integrin, selectin). Korábbi eredmények alapján az exoszómákhoz hasonlóan az annexin V-öt a MV-ra általánosan jellemző markerként írták le. Az újabb kutatások azonban megállapították, hogy a vérlemezke eredetű MV-k 80%-a annexin V negatív [163]. A MV-kat – az exoszómákhoz hasonlóan - is foszfolipid kettősréteg határolja. Nagyobb méretűek, mint az exoszómák, átmérőjük általában 100-1000 nm közé esik. Érdeemes megemlíteni, hogy vérplazmában méretük kisebb, körülbelül 100-400 nm. A MV-kat elsősorban vérlemezkék, vörösvértestek és endoteliális sejtek hoznak létre. Hasonlóan az exoszómákhoz többféle RNS-t (kódoló és nem-kódoló) is tartalmaznak [142]. Ellentétben az exoszómákkal, a MV-kbe történő RNS szekréció kevésbé tűnik specifikus folyamatnak. Ugyanakkor jelentős átfedés van az exoszómák és MV-k közötti mérettartományban. Bár sejtfelszíni markereik jelentős eltérést mutatnak, továbbra sem rendelkezünk, olyan általánosan elfogadott markerrel, ami révén az exoszómák és MV-k biztonsággal elkülöníthetőek lennének.

A miRNS-ek EV-kba szecernálása egyelőre nem teljesen tisztázott terület. Központi szereplőnek a neutrális szfingomielináz 2 enzim tűnik [164]. Az enzim az exoszómák kialakulásában is meghatározó funkcióval rendelkezik. A miRNS-ek szekrécióját a poszt-transzkripcionális módosulásaik döntő mértékben befolyásolják. A vezikulákba történő szekréciót nagymértékben fokozza a 3' végen történő uridiláció, míg adeniláció esetében a miRNS-ek jellemzően a sejtben maradnak [165]. Továbbá bizonyos specifikus nukleotid mintázat esetén is ritka a vezikulákba történő kiválasztódás [166].

Az EV-k harmadik típusa az apoptotikus testek. Az apoptotikus testek a programozott sejthalál révén a degradálódó sejt sejttermelékéből alakulnak ki. Az EV-k között ezek érik el a legnagyobb méretet, nagyságuk általában 1000-5000 nm közé esik. Tartalmukra a nagy mennyiségű foszfatidil szerin, DNS tartalom, illetve sejtorganelum maradványok jellemzőek.



3. ábra: Az extracelluláris vezikulák típusai

A folyamat részletes leírása a szövegben olvasható. MVB: multivezikuláris test

1.4. MikroRNS-ek a mellékvesekéreg daganataiban

Munkacsoportunk az elsők között vizsgálta a mellékvesekéreg daganatok szöveti miRNS-ek expressziós mintázatát. Ebben a munkában az ACC, CPA, NFA és egészséges mellékvesekéreg szöveti miRNS expresszióját elemezték. [113]. TLDA-kártya eredményei alapján kiválasztott 14 miRNS közül egy nagyobb elemszámú kísérletben 6 miRNS-t tudtak visszaigazolni qRT-PCR módszerrel. Ezek alapján a miR-184 és miR-503 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott ACC-ben a normál mellékvesekéreggel, illetve az adenomákkal (inaktív és kortizoltermelő) összehasonlítva. A miR-210 csak CPA-hoz képest expresszáldott felül a carcinomás betegcsoportban. Ezzel ellentétben a miR-214, a miR-375 és miR-511 szignifikáns mértékben alulexpresszáldott ACC-ben a többi csoporthoz viszonyítva. ROC-analízis alapján a miR-511 és miR-503 expressziójának különbségét használva 100 %-os szenzitivitással és 97 %-os specificitással tudták differenciálni a két entitást. E vizsgálat fő korlátját a kis elemszámú csoportok képezték, hiszen mindössze 7 ACC-ben

szenvedő beteget vontak be. Egy másik munkacsoport microarray módszerrel egy nagyobb elemszámú (22 ACC és 27 ACA) vizsgálatban először mutatták ki sikerrel a miR-483-5p szignifikánsan magasabb szöveti expresszióját ACC-ben ACA-hoz viszonyítva [167]. Leírták még a miR-195 és a miR-335 csökkent expresszióját is ACC-ben [167]. Prognosztikai markerként pedig megállapították, hogy a miR-483-5p fokozott és a miR-195 csökkent kifejeződése rossz kórjósallal társul [167]. Egy újabb microarray vizsgálattal a fent említett miRNS-eken kívül a miR-483-3p fokozott, míg a miR-100 és miR-125b csökkent expresszióját találták ACC-re jellemző markernek [168]. Egyes kutatócsoportok az adrenocorticalis carcinoma legérzékenyebb markereként a fokozott miR-503, illetve a csökkent miR-335 és miR-675 expressziót írták le [169, 170]. Ezt követően több tanulmányban is azonosították szöveti miRNS-ek közül a miR-483-3p, miR-483-5p, miR-503 és miR-210 fokozott, míg a miR-195 és miR-335 csökkent expresszióját [171, 172] **(3. táblázat)**. Ezen eredményeket újgenerációs szekvenálással elvégzett kutatások is igazolták [22, 173]. Bár a vizsgálatok többsége kellően magas szenzitivitási és specificitási értékkel tudta elkülöníteni az adenomát a carcinomától, azonban az egyes eredmények között jelentős eltérések is igazolódtak [174]. A diszkrepancia hátterében az eltérő metodika, a referenciagének különbözősége és a viszonylagos alacsony elemszámú betegcsoportok állhatnak [175]. Az ismertetett miRNS-ek közül a miR-483 család két tagja (miR-483-3p és miR-483-5p) érdemel külön említést, mivel génjük az ACC-ben leggyakrabban felülexpresszáladó IGF-2 gén második intronjában helyezkedik el [176]. Fontos kiemelni, hogy míg utóbbi pontos hatásmechanizmusát ACC-ben nem ismerjük, addig a miR-483-3p célpontjaként az apoptosist gátló PUMA tumor szuppresszor gént azonosították [7]. A miR-210 a szervezet fő hypoxia-asszociált miRNS-e. Szintjét hypoxiás állapotokban a hypoxia indukált faktor 1 α serkenti. Több daganatban, köztük ACC-ben is leírták fokozott expresszióját [175]. A miR-195 célpontjai közé tartoznak a miRNS bioszintézisben kulcsszerepet játszó Dicer és TARBP2 molekulák, melyeknek szintje ACC-ben magasabb [177]. Egyes eredmények alapján a ZNF367 fehérjét kódoló gén kifejeződését is befolyásolja a miR-195, mely gén fiziológiás körülmények között felnőtt szervezetben már nem fejeződik ki [178]. A miR-503 és a miR-335 szerepe adrenocorticalis carcinoma kialakításában azonban egyelőre tisztázatlan.

Az extracelluláris miRNS-ek felfedezését követően, a különféle daganatokra jellemző keringő miRNS mintázatot írtak le [139]. Adrenocorticalis carcinomában szenvedő betegeknél eddig kevés vizsgálat elemezte a keringő miRNS mintázatot.

Munkacsoportunk teljes plazmából izolált 5 miRNS esetén (miR-100, miR-181b, miR-184, miR-210 és miR-483-5p) szignifikánsabb magasabb, míg a miR-195 esetén alacsonyabb kifejeződést talált a ACC-ben ACA-hoz viszonyítva [179]. Két további tanulmány elemezte a keringő miRNS-ek expresszióját mellékvesekéreg-daganatos betegek vérérszámában [180, 181]. Mindkét vizsgálat kimutatta a miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszáldását ACC-ben ACA-hoz viszonyítva. Egyik tanulmányban ezenkívül a miR-34a fokozott kifejeződését írták le [181], míg Chabre és munkatársai a miR-195 és a miR-335 csökkent expresszióját igazolta adrenocorticalis carcinomában [180]. Ez a tanulmány eltérést talált az agresszív, illetve a kevésbé agresszív ACC-ben szenvedő betegek szérumban a keringő miR-483-5p kifejeződésében [180]. Ezt az eredményt egy másik, teljes plazmából kiinduló kutatás is megerősítette [182]. Ebben a vizsgálatban a hsa-miR-483-5p abszolút mennyiségének meghatározását végezték el, és szignifikánsan magasabb expressziót találtak az előrehaladott (3-4. stádium), illetve a lokális ACC (1-2. stádium), az adenoma és az egészséges, mellékvesekéreg-daganatban nem szenvedő csoportok között [182]. Ugyanakkor egyik vizsgálat sem volt képes a klinikai gyakorlatban alkalmazható kellően magas szenzitivitási és specificitási értékkel elkülöníteni a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatot.

Összefoglalásként elmondható, hogy a keringő miRNS vizsgálatoknál szintén sikerrel mutatták ki a miR-335 és miR-195 csökkent [180], míg a miR-483-5p és miR-210 fokozott kifejeződését ACC-ben szenvedő betegek plazma [179], illetve szérumban mintáiban adenomához viszonyítva [180, 181] **(3. táblázat)**. Újabb vizsgálati eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy az extracelluláris vezikula eredetű miRNS-ek érzékenyebb markerek lehetnek, mint a teljes vérből származóak. Így munkánk során az EV-asszociált miRNS-ek vizsgálatát végeztük el jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatban szenvedő betegeknél.

3. táblázat: Több tanulmányban is megerősített megváltozott kifejeződésű miRNS-ek adrenocorticalis carcinomában

A vastagon szedett miRNS-ek eltérő expresszióját a tanulmányok legalább felében igazolták, míg a normál módon szedett miRNS-ek eltérő kifejeződését maximum két tanulmány erősítette meg. ACC: adrenocorticalis carcinoma

Fokozott kifejeződés ACC-ben	Csökkent kifejeződés ACC-ben
miR-139-5p	miR-195
miR-184	miR-214
miR-210	miR-335
miR-483-3p	miR-497
miR-483-5p	
miR-503	

2. CÉLKITŰZÉSEK

A mellékvese-daganatok preoperatív diagnózisa nehéz, különösen a nagyméretű jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítése, valamint a kisméretű rosszindulatú daganatok felismerése okoz nehezségeket. A mikroRNS-ek előzőekben részletezett vizsgálati eredményei hasznos segítséget jelenthetnek, de a keringő miRNS-ek korábbi érzékenységi-fajlagossági adatai rutinszerű klinikai alkalmazásra még nem voltak megfelelőek. Vizsgálataimban ezért az extracelluláris vezikulák mikroRNS-eit tanulmányoztam, hiszen azok aktív szekréciójuk lévén specifikusabbak lehetnek a kisebb mennyiségük ellenére, mint a teljes plazmából vagy szérumból izolált mikroRNS-ek.

Tekintettel arra, hogy mellékvesekéreg daganatokban az extracelluláris vezikula-asszociált mikroRNS-ek expressziója eddig nem volt ismert, ezért kísérleteinkkel e hiányt szeretnénk volna pótolni. Munkám alapvetően két részből tevődött össze. Első felében preoperatív plazma EV-asszociált mikroRNS-ek expressziós profilját vizsgáltuk és hasonlítottuk össze ACA és ACC csoportok között. Munkám második részében hormonálisan inaktív (NFA) és kortizoltermelő mellékvesekéreg adenoma (CPA) és kortizoltermelő mellékvesekéreg carcinoma (CP-ACC) EV-asszociált mikroRNS-ek expresszióját vizsgáltuk annak kérdésével, hogy a kortizoltermelés és a keringő mikroRNS profil között felállítható-e összefüggés. Doktori munkám során az alábbi célokat állítottam fel, ill. kérdésekre kerestem a választ.

Célom volt:

1. Mellékvesekéreg daganatban szenvedő betegek vérmintáiban az extracelluláris vezikulák mikroRNS mintázatának vizsgálata a diagnosztikában alkalmazható minimálisan invazív, malignitást előrejelző biomarkerek azonosítása céljából.
2. Vérplazma eredetű EV-asszociált mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata hormonálisan inaktív adenomában és kortizoltermelő jó- és rosszindulatú daganatokban szenvedő betegek körében.

3. Keringő EV-asszociált mikroRNS-ek kifejeződésének és a kortizolszekréciós paraméterek közötti kapcsolatának vizsgálata.

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegek és plazmaminták

Munkám első részében összesen 46 preoperatív plazmamintát vizsgáltunk. 24 beteg mellékvesekéreg adenomában, míg 22 páciens szövettanilag igazolt mellékvesekéreg-rákban szenvedett. Nemzetközi kollaboráció keretében a minták a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikájáról, a Padovai Egyetem Általános Orvostudományi Kar Endokrinológiai osztályáról, a Firenzei Egyetem Endokrinológiai osztályáról és a Rochesteri Mayo Klinika Belgyógyászati osztályáról származtak. A felfedező kohorsz 6 ACA-ból (férfi/nő: 0/6; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: 66,17 \pm 7,17 év; hormontermelés: 3 inaktív, 1 szubklinikus-, 1 manifeszt kortizol, 1 aldoszteron) és 6 ACC-ből (férfi/nő: 1/5; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: 49,17 \pm 9,5 év; hormontermelés: 3 inaktív, 2 kortizol, 1 szubklinikus tesztoszteron) állt, míg a validációs kohorsz 18 ACA-ban (férfi/nő: 6/12; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: 55,89 \pm 15,28 év; hormontermelés: 13 inaktív, 4 kortizol, 1 aldoszteron) és 16 ACC-ben (férfi/nő: 5/11; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: 46,13 \pm 17,45 év; hormontermelés: 6 inaktív, 4 kortizol, 2 tesztoszteron, 1 szubklinikus kortizol, 1 androgének, 1 kortizol+androgének, 1 szubklinikus kortizol+androgének) szenvedő betegből tevődött össze. A vizsgálatokat a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (ETT engedély száma: 54624/2015/EKU, 1942-2/2016/EKU), illetve a plazmaminták felhasználása minden esetben a betegek tájékozott beleegyezésével történt.

A diagnózis felállítása az összes esetben az aktuális szakmai protokollok alapján, a jelentkező klinikai tünetek, képalkotó vizsgálatok és a teljes hormonprofil eredményeinek birtokában történt, amelyet az operált esetekben a kórszövettani lelet is megerősített. Az ACC tumor stádium beosztása az ENSAT kritérium rendszer alapján történt [53]. A betegek a vérvétel előtt semmilyen kemo- vagy radioterápiában nem részesültek. A betegek részletes klinikai adatait az **4. táblázat** mutatja.

4. táblázat: A jó- és rosszindulatú mellékveskéreg daganatok keringő miRNS profiljait összehasonlító vizsgálatba bevont ACA-ban és ACC-ban szenvedő betegek klinikai jellemzői

ACA= adrenocorticalis adenoma, ACC= adrenocorticalis carcinoma, HPF= nagy nagyítású látótér (high power field) n.a.= nincs adat

A Ki-67 vagy mitotikus indexet, a Weiss-értéket és az ENSAT tumor stádiumot ACA-ban rutinszerűen nem határozzák meg.

Tumor típus	Kohorsz	Nem	Életkor (év)	Hormon-termelés	Ki-67 (%) vagy mitotikus index	Weiss érték	ENSAT tumor stádium
ACC-1	Felfedező	Nő	51	Kortizol	25%	9	1
ACC-2	Felfedező	Nő	62	Szubklinikus tesztoszteron	5/10 HPF	7	3
ACC-3	Felfedező	Nő	46	Inaktív	10/10 HPF	6	4
ACC-4	Felfedező	Férfi	43	Inaktív	n.a.	6	4
ACC-5	Felfedező	Nő	57	Inaktív	20-25%	5	4
ACC-6	Felfedező	Nő	36	Kortizol	n.a.	n.a.	4
ACC-7	Megerősítő	Nő	67	Kortizol	n.a.	n.a.	4
ACC-8	Megerősítő	Nő	39	Szubklinikus kortizol	10%	7	1
ACC-9	Megerősítő	Nő	57	Inaktív	n.a.	5	4
ACC-10	Megerősítő	Férfi	80	Inaktív	n.a.	9	3
ACC-11	Megerősítő	Nő	56	Tesztoszteron	n.a.	6	2
ACC-12	Megerősítő	Férfi	53	Inaktív	n.a.	9	3
ACC-13	Megerősítő	Nő	31	Kortizol	n.a.	6	2
ACC-14	Megerősítő	Nő	58	Tesztoszteron	2/10 HPF	4	3
ACC-15	Megerősítő	Nő	24	Androgének	10%	5	2

Tumor típus	Kohorsz	Nem	Életkor (év)	Hormon-termelés	Ki-67 (%) vagy mitotikus index	Weiss érték	ENSAT tumor stádium
ACC-16	Megerősítő	Nő	22	Szubklinikus kortizol és androgének	10%	3	1
ACC-17	Megerősítő	Férfi	62	Kortizol	30%	7	2
ACC-18	Megerősítő	Férfi	48	Kortizol	15%	8	3
ACC-19	Megerősítő	Nő	38	Kortizol, androgének	70%	8	2
ACC-20	Megerősítő	Nő	32	Inaktív	5%	3	1
ACC-21	Megerősítő	Nő	20	Inaktív	5	3	4
ACC-22	Megerősítő	Férfi	51	Inaktív	2%	n.a.	4
ACA-1	Felfedező	Nő	64	Aldoszteron	-	-	-
ACA-2	Felfedező	Nő	73	Inaktív	-	-	-
ACA-3	Felfedező	Nő	63	Inaktív	-	-	-
ACA-4	Felfedező	Nő	59	Szubklinikus kortizol	-	-	-
ACA-5	Felfedező	Nő	77	Inaktív	-	-	-
ACA-6	Felfedező	Nő	61	Kortizol	-	-	-
ACA-7	Megerősítő	Nő	38	Inaktív	-	-	-
ACA-8	Megerősítő	Nő	74	Inaktív	-	-	-
ACA-9	Megerősítő	Nő	52	Inaktív	-	-	-
ACA-10	Megerősítő	Férfi	29	Inaktív	-	-	-
ACA-11	Megerősítő	Férfi	71	Inaktív	-	-	-
ACA-12	Megerősítő	Nő	81	Inaktív	-	-	-
ACA-13	Megerősítő	Férfi	63	Inaktív	-	-	-
ACA-14	Megerősítő	Férfi	50	Inaktív	-	-	-

Tumor típus	Kohorsz	Nem	Életkor (év)	Hormon-termelés	Ki-67 (%) vagy mitotikus index	Weiss érték	ENSAT tumor stádium
ACA-15	Megerősítő	Nő	50	Kortizol	-	-	-
ACA-16	Megerősítő	Nő	69	Kortizol	-	-	-
ACA-17	Megerősítő	Nő	46	Aldoszteron	-	-	-
ACA-18	Megerősítő	Férfi	62	Kortizol	-	-	-
ACA-19	Megerősítő	Nő	33	Kortizol	-	-	-
ACA-20	Megerősítő	Nő	35	Inaktív	-	-	-
ACA-21	Megerősítő	Nő	65	Inaktív	-	-	-
ACA-22	Megerősítő	Nő	54	Inaktív	-	-	-
ACA-23	Megerősítő	Nő	66	Inaktív	-	-	-
ACA-24	Megerősítő	Férfi	68	Inaktív	-	-	-

Munkám második részében a fent felsorolt intézményekben kezelt összesen 35 mellékvesekéreg-daganatban szenvedő beteg preoperatív plazmamintáit elemeztük. Közülük 13 hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenoma (NFA) (férfi/nő: 2/11; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: $57,77 \pm 12,73$ év), 13 kortizoltermelő adrenocorticalis adenoma (CPA) (férfi/nő: 1/12; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: $49,77 \pm 13,87$ év) és 9 kortizoltermelő adrenocorticalis carcinoma (CP-ACC) (férfi/nő: 4/5; átlag életkor a vérvétel idején \pm SD: $54,67 \pm 12,07$ év) volt. Minden esetben vizsgáltuk a hormonprofil, és a hypercortisolismus diagnózisának meghatározása a jelenlegi irányelvek alapján történt [6]. Mind a CPA, mind a CP-ACC csoportba csak olyan betegeket vontunk be, akiknek egyértelmű manifeszt Cushing szindrómájuk volt. E mellett elemeztük a korrelációt a keringő miRNS-ek (-dCT) szintje és a kortizol

paraméterek között. Vizsgáltuk a bazális kortizol szintet, a 24 órás gyűjtött vizelet szabad kortizol szintjét és a kortizol szintet kis dózisú dexametazon szuppressziós teszt (LDDT) után. A betegek klinikai adatait az **5. táblázat** mutatja be. Ezen kívül 7 plazma párban elemeztük a miRNS-ek kifejeződésének változását normális hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengellyel rendelkező páciensek esetén LDDT előtt és után.

5. táblázat: A hormonálisan inaktív adenomák és kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatok vizsgálatába bevont betegek klinikai jellemzői.

NFA: Nem funkcionáló adrenocorticalis adenoma, CPA: kortizoltermelő adrenocorticalis adenoma, CP-ACC: kortizoltermelő adrenocorticalis carcinoma, n.a.: nincs adat, LDDT: kis dózisú dexametazon teszt (low dose dexametasone test)

A Ki-67 (%) indexet, a Weiss-értéket és az ENSAT tumor stádiumot NFA-ban és CPA-ban rutinszerűen nem határozzák meg.

Tumor típus	Életkor (év)/ Nem	Hormon- termelés	Ki-67 (%)	Weiss érték	ENSAT Tumor stádium	Bazális reggeli kortizol (nmol/l)	Kortizol LDDT után (nmol/l)	Vizelet szabad kortizol (nmol/24h)
NFA-1	56/Nő	Inaktív	-	-	-	440,6	n.a.	52,3
NFA-2	58/Nő	Inaktív	-	-	-	494,14	n.a.	212,4
NFA-3	66/Nő	Inaktív	-	-	-	361,98	42,21	16,8
NFA-4	81/Nő	Inaktív	-	-	-	579,39	n.a.	n.a.
NFA-5	54/Férfi	Inaktív	-	-	-	256,6	19	n.a.
NFA-6	73/Nő	Inaktív	-	-	-	381	n.a.	n.a.
NFA-7	52/Nő	Inaktív	-	-	-	400	n.a.	97
NFA-8	63/Nő	Inaktív	-	-	-	217	n.a.	n.a.
NFA-9	38/Nő	Inaktív	-	-	-	163,82	41	413,85
NFA-10	60/Nő	Inaktív	-	-	-	358,67	39	206,925

Tumor típus	Életkor (év)/ Nem	Hormon- termelés	Ki-67 (%)	Weiss érték	ENSAT Tumor stádium	Bazális reggeli kortizol (nmol/l)	Kortizol LDDT után (nmol/l)	Vizelet szabad kortizol (nmol/24h)
NFA-11	50/Férfi	Inaktív	-	-	-	609	38	n.a.
NFA-12	35/Nő	Inaktív	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.
NFA-13	65/Nő	Inaktív	-	-	-	n.a.	n.a.	188
CPA-1	37/Nő	Kortizol	-	-	-	200,9	316,45	1387
CPA-2	61/Nő	Kortizol	-	-	-	474,8	252,17	75,3
CPA-3	50/Nő	Kortizol	-	-	-	623,3	673,19	1022
CPA-4	62/Férfi	Kortizol	-	-	-	676	n.a.	974
CPA-5	59/Nő	Kortizol	-	-	-	579,39	524	386,26
CPA-6	62/Nő	Kortizol	-	-	-	689,75	690	7007,86
CPA-7	51/Nő	Kortizol	-	-	-	275,9	n.a.	1682,99
CPA-8	55/Nő	Kortizol	-	-	-	n.a.	n.a.	1347
CPA-9	24/Nő	Kortizol	-	-	-	1114	510	220
CPA-10	43/Nő	Kortizol	-	-	-	420	n.a.	n.a.
CPA-11	47/Nő	Kortizol	-	-	-	n.a.	361,4	589
CPA-12	27/Nő	Kortizol	-	-	-	954	n.a.	n.a.
CPA-13	69/Nő	Kortizol	-	-	-	n.a.	103,6	n.a.
CP-ACC-1	67/Nő	Kortizol	n.a.	n.a.	4	1771,3	1561,5	3235,1
CP-ACC-2	36/Nő	Kortizol	n.a.	n.a.	4	3233,51	n.a.	15612
CP-ACC-3	51/Nő	Kortizol	25	9	3	742	141	n.a.
CP-ACC-4	62/Férfi	Kortizol	30	7	2	693	796	n.a.
CP-ACC-5	48/Férfi	Kortizol	15	8	3	728	n.a.	n.a.
CP-ACC-6	38/Nő	Kortizol	70	8	2	411	n.a.	n.a.

Tumor típus	Életkor (év)/ Nem	Hormon- termelés	Ki-67 (%)	Weiss érték	ENSAT Tumor stádium	Bazális reggeli kortizol (nmol/l)	Kortizol LDDT után (nmol/l)	Vizelet szabad kortizol (nmol/24h)
CP-ACC-7	58/Férfi	Kortizol	30	n.a.	2	672,6	n.a.	2277,6
CP-ACC-8	64/Nő	Kortizol	30	5	4	1491	n.a.	10743
CP-ACC-9	68/Férfi	Kortizol	n.a.	n.a.	1	364,5	394,81	8795

3.2. Extracelluláris vezikula izolálás és EV preparátumok vizsgálata

3.2.1. Extracelluláris vezikula izolálás

Mindkét munkámban az összes minta esetén, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)-val alvadásgátolt vér levétele után azonnal plazmaizolálás történt. A plazmát 4 °C-on 10 percen keresztül 1000 x g-n történő centrifugálva nyertük. A kivont plazmát -80 °C-on tároltuk a további felhasználásig. Hemolízist nem észleltünk ilyen tárolási körülmények között.

Munkám első részében két különböző EV izolálási módszert is használtunk. A parallel eredmények miatt, második munkámban már csak 200 µl plazmából kiindulva hajtottuk végre az EV izolálást precipitációs módszerrel Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) felhasználásával a gyártó utasításai szerint.

Második módszerként plazmából differenciált centrifugálási és szűrési protokoll alapján izoláltuk az EV-kat. Első lépésként a sejtes komponenseket centrifugálással távolítottuk el (2500 x g, szobahőmérséklet, 15 perc), majd az így kapott vérlemezke-mentes plazmát kétszeres térfogatra hígítottuk foszfát-puffer-sóval (phosphate-buffered saline, PBS). Ezt követően a plazmát 0,8 µm filteren (Merck Life Science, Darmstadt, Németország) szűrtük át nyomás nélkül, hogy eltávolítsuk a maradék vérlemezkéket és

apoptotikus testeket. Az EV-k izolálása 6 ml hígított plazmából kiindulva ultracentrifugálással történt 100000 x g-n, 60 percen keresztül 4 °C-on MLA-55 rotorral (BC-Optima TM Max-XP, MLA-55, A/D, Beckmann Coulter, Brea, CA, USA). A felülúszó eltávolítása után a pelletet 90 µl PBS-sel reszuszpendáltuk. Az oldatot szarvasmarha hasnyálmirigy eredetű Ribonukleáz A-val kezeltük öt percig (PN: R1158-2.5KU, Merck Life Science), annak céljából, hogy eltávolítsuk a nem vezikulában lévő RNS-eket [157][183]. Az oldathoz az RNáz kezelés leállításához ultracentrifugált és szűrt 0,1 %-os szarvasmarha szérum albumint (bovine serum albumin-BSA) és RNS gátló koncentrátumot (ProtectRNA RNase Inhibitor 500x Concentrate PN: R7397, Merck Life Science) adtunk. Ezt követően mosás céljából újabb ultracentrifugálást végeztünk 100000 x g-n, 4 °C-on, 60 percig. Az így kapott exoszómákban dús izolátumot 700 µl QiAzol Lízis Reagenssel szuszpendáltuk. A mintákat -20 °C-on tároltuk a további felhasználásig, 1-3 napig.

3.2.2. EV preparátumok vizsgálata

3.2.2.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az ultracentrifugálással izolált EV-hoz 3%-os paraformaldehid és 1%-os glutáraldehid keveréket tartalmazó 0,01 M PBS-t adtunk hozzá, majd a mintákat 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően lecseréltük a fixálót és másnapig 4°C-on tároltuk, majd kétszer mostuk át PBS-sel. A PBS eltávolítás után a posztfixáció céljából 30 percen keresztül 1%-os OsO₄-et adtunk hozzá (Taab, Aldermaston, Berks, Egyesült Királyság). A fixált pelletet desztillált vízzel áztattuk, majd etil-alkohollal dehidratáltuk. Ehhez 1%-os uranil-acetátot tartalmazó 50 %-os etil-alkoholt alkalmaztunk 30 percig a blokkoláshoz, majd a preparátumot Taab 812-be helyeztük (Taab). 60 °C-os éjszakai polimerizáció után ultravékony metszeteket készítettünk. A metszetek elemzéséhez Megaview II (Soft Imaging System, Németország) digitális kamerával felszerelt Hitachi 7100 elektronmikroszkópot (Hitachi Ltd., Japán) használtunk.

3.2.2.2. Áramlási citometria

Az extracelluláris vezikulák direkt mérése áramlási citometriával limitált, mivel az áramlási citométer felbontása miatt a direkt módszer ugyan a mikrovezikulák egy részét kimutatja, azonban az exoszómákat nem. Emiatt először az EV-kat formaldehid/szulfát Latex gyöngyök (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) felszínéhez kötöttük. Röviden összefoglalva, a PBS-ben reszuszpendált EV-ket 3,8 μm átmérőjű 4 v/v%-os gyöngyökhöz adtuk hozzá. Negatív kontrollként 2%-os BSA-t használtunk. Ezután a mintákat egész éjszaka inkubáltuk 4 °C-on állandó forgatás mellett (5 x g). A gyöngyöket blokkolás céljából 200 μl 100 mM glicerín oldatban reszuszpendáltuk és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ezután még 1 óráig 2 %-os BSA-ban inkubáltuk, majd a csövet 0,9 %-os NaCl oldattal feltöltöttük és mosás céljából a mintákat 10 percig 2000 x g centrifugáltuk. A gyöngyöket NaCl oldatban reszuszpedáltuk, majd a vizsgálat szerint osztottuk szét. Munkánk során a CD9 (FITC, Sigma; #: SAB4700095), a CD63 (PE, Sigma; #: SAB4700218), a CD81 (FITC, Molecular Probes; #A15753) és az annexin V (FITC, SONY; #3804530) molekulákat vizsgáltuk. Összesen 6 mintát elemeztünk (3 mintából az EV-k izolálása ultracentrifugálási módszerrel, míg 3 mintából Total Exosome Isolation Kit (from plasma) segítségével történt). Az áramlási citometriát FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, Ca, USA) eszközön hajtottuk végre. Az adatok elemzéséhez FlowJo szoftvert használtunk (Tri Star Inc.; Ashland, OR, USA).

Az ultracentrifugálással történő EV izolálást, a transzmissziós elektronmikroszkópia elvégzését és az áramlási citometria végrehajtását és kiértékelését a módszerben szakértő: Kittel Ágnes (Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Gyógyszerkutatási Osztály, Magyar Tudományos Akadémia), Pálóczi Krisztina és Prof. Dr. Buzás Edit végezték (Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem).

3.2.2.3. EV méreteloszlás meghatározás

Az EV-k méreteloszlását dinamikus fényszórás módszerrel (Dynamic Light Scattering-DLS) Zetasizer Nano S eszközön (Malvern Instrument Ltd, Malver, Egyesült Királyság) határoztuk meg 4 Total Exosome Isolation Kit-tel (from plasma) izolált minta esetén. A DLS vizsgálat elvégzését és kiértékelését a módszerben tapasztalt (Mészáros Tamás, SeroScience Kft és Nanomedicina Kutató és Oktató Központ, Semmelweis Egyetem) végezte. A Brown-mozgást végző szuszpendált részecskék diffúziós állandóját egy 633 nm-es hélium-neon lézer fényszórásának intenzitás változásán keresztül határoztuk meg. A méreteloszlás értékeléséhez a szoftverbe beépített Stokes-Einstein egyenletet alkalmaztuk, amiből a hidrodinamikai átmérő számolható ki. A Z-átlag az elsődleges és a legstabilabb érték, amelyet DLS technikával lehet nyerni [184], így fontos szerepe van a minőség ellenőrzésben is. A Z-átlagérték jó megközelítést biztosít a hidrodinamikai átmérő megbecslésére a jól elosztatott részecskék esetén. A polidiszperzitási index (Pdi) jól megbecsüli az eloszlás szélességét, mely kumuláns analízissel számolható. A DLS 25 ± 1 °C-on történt. Az EV-k (refraktív index: 1,370) 1x-es steril PBS-ben voltak szuszpendálva. A PBS viszkozitása 25 °C-on 0.8882 cP volt, míg a refraktív indexe: 1,330. A mintákat 1 percig 25 °C-on ekvilibráltattuk.

3.3. RNS-izolálás és mikroRNS expressziós vizsgálatok

3.3.1. Plazma EV-asszociált RNS izolálás

Mindkét munkám esetén az EV izolálást rögtön követte a teljes RNS kivonás Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával. A validációs kohorszban az RNS izolálás hatékonyságának megítélésére 5 µl 5nM Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic (Qiagen GmbH) spike-in kontroll hozzáadása történt az Acid-Phenol: Chloroform lépés előtt. Habár a cel-miR-39 nem tekinthető egyértelműen megfelelő biológiai kontrollnak, de a miRNS izolálás hatékonyságának jelzésére és a bemért RNS mennyiség markereként gyakran alkalmazzák

referenciagénként. A végleges RNS eluátum mennyisége 50 µl volt. Az RNS-t -70 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

Munkám első részében a különböző centrifugálási/ultracentrifugálási módszerekkel izolált EV-kból is izoláltunk RNS-t (n=4 ACA, n=4 ACC). Az RNS izoláláshoz RNeasy Mini Kit (ID:74104, Qiagen GmbH) and RNeasy MinElute Cleanup Kit (ID:74204, Qiagen GmbH) használtunk a gyártó utasításai szerint. A vezikuláris RNS-ek elemzéséhez kapilláris elektroforézist alkalmaztunk (Agilent Small RNA Kit (CN:5067-1548) Agilent 2100 Bioanalyzer felhasználásával (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). 1 µl RNS-t tartalmazó oldatot analizáltunk a gyártó utasításai szerint. 0,5 µl 5nM Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic (Qiagen GmbH) hozzáadása történt az RNS eluátumhoz a reverz transzkripció folyamán.

3.3.2. Nagy áteresztőképességű miRNS expressziós mérések

Az EV-asszociált miRNS expresszió profilozást összesen 12 mintán végeztük el (n=6 ACA, n=6 ACC), a korábban Total Exosome Isolation Kit (from plasma) és Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit felhasználásával izolált EV-asszociált RNS-ek esetén (Thermo Fisher Scientific). A minták elemzéséhez a Megaplex Pools for microRNA expression Analysis protokollt (PN: 4399721B, Thermo Fisher Scientific) használtuk szigorúan a gyártó utasításai szerint. Röviden összefoglalva a korábban izolált RNS-t reverz transzkripció során komplementer DNS-sé (cDNS) írtuk át a TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (PN: 4366597, Thermo Fisher Scientific) és a Megaplex RT Primers Human Pool A v2.1 (PN: 4399966, Thermo Fisher Scientific) felhasználásával Proflex Base PCR rendszeren (Thermo Fisher Scientific). A valós idejű PCR reakció előtt, a preamplifikáció nélküli cDNS-t amplifikáltuk a TaqMan PreAmp Master Mix (2x) (PN: 4384266, Thermo Fisher Scientific) és a Megaplex preAmp Primers (10x) Human Pool A v2.1 (PN: 4399233, Thermo Fisher Scientific) felhasználásával a gyártó utasításai szerint. A hígított PreAmp terméket ezek után TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2x (PN: 4324018, Thermo Fisher Scientific) elegyítettük, majd TaqMan Array Human MicroRNA kártyákra v2.0 pool A (PN: 4398977, Thermo Fisher Scientific) töltöttük fel és QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR rendszeren (Thermo Fisher Scientific) elemeztük. Minden mintát A kártyával vizsgáltunk, így összesen mintánként 377 emberi miRNS expresszióját vizsgáltuk.

Kvantitatív PCR alapú TaqMan Low Density Array (TLDA) nyers adatok, küszöb beállítások és az alap statisztikai számítások elvégzését az Applied Biosystems qPCR Analysis Modules on Thermo Fisher Cloud (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/cloud.html>) szoftverrel végeztük el. Mivel a TLDA kártyán sem a cel-miR-39, sem egyéb általánosan elfogadott keringő miRNS referencia nem szerepelt [185], a normalizálás egy referencia mintához történt, majd a Fold Change-t jelöltük közvetlenül a minták között. Biológiai referencia csoportként az ACA mintákat használtuk. A konfidencia intervallumot 95 %-ra állítottuk be és Benjamini-Hochberg korrekciót alkalmaztunk a p érték kiszámításához. A maximum engedélyezett CT (cycle threshold) értéket 40-re állítottuk be, így azon miRNS-ek,

amelyek nem amplifikálódtak a 40 ciklus végéig, azokat nem expresszáldóóknak tekintettük. Az expresszió prevalenciájának megítélésére Fisher-exakt tesztet használtunk azon miRNS-ek között, amelyek nem expresszáldóódtak az összes mintában.

3.3.3. Validálás egyedi kvantitatív PCR mérésekkel

Nagy áteresztőképességű kvantitatív PCR alapú TLDA mérések alapján, kettő olyan miRNS-t találtunk, amely tendenciózus mértékben eltérően expresszáldóó az ACA és az ACC csoport között. Ezt a két miRNS-t, a hsa-miR-101-t (002253) és hsa-miR-483-5p-t (002338) vizsgáltuk valós idejű kvantitatív PCR módszerrel összesen 34 olyan mintán, amelyek a felfedező csoportban nem szerepeltek (n=18 ACA, n=16 ACC). A teljes RNS-t (5 µl) reverz transzkripció során cDNS-sé írtuk át a targetekre specifikus TaqMan microRNA Assays (PN 442795, Thermo Fisher Scientific) és a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával Proflex Base PCR rendszeren (Thermo Fisher Scientific). A reakció végtérfogata 15 µl volt (hőprogram: 16 °C 30 perc, 42 °C 30 perc, 85 °C 5 perc). A kiválasztott miRNS-ek expresszió méréséhez kvantitatív valós idejű PCR-t TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (PN: 4352042, Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával hajtottuk végre 7500 Fast Real-Time PCR rendszeren (PN 4364031E, Thermo Fisher Scientific). A gyártó utasításaitól (TaqMan Small RNA Assays (PN 4364031E, Thermo Fisher Scientific) csak minimális mértékben tértünk el. A reakció végtérfogata 15 µl volt (hőprogram: 95 °C 20 másodperc, majd 40 ciklus: 95 °C 3 másodperc; 60 °C 30 másodperc). Minden miRNS expressziós mérést három technikai párhuzamossal (triplikátumban) végeztem el. A negatív kontroll reakció nem tartalmazott cDNS templátot. A referencia a cel-miR-39 volt. Az adatok értékeléséhez a -dCT (CT) módszert alkalmaztuk (-DCT érték= -[target CT érték- belső kontroll CT érték]). Az elemzéshez Microsoft Excel 2010 szoftvert használtunk (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Az ultracentrifugálási módszerrel izolált EV-asszociált miRNS-ek expresszióját a fent részletezett módon elemeztük. A hsa-miR-483-5p expresszióját hasonlítottuk össze ACA és ACC között, referenciaként itt is a cel-miR-39-et használtuk.

Munkám második részében, a kortizoltermelő és hormonálisan inaktív daganatok összehasonlítása keretében irodalmi adatokat és kutatócsoportunk korábbi eredményeit áttekintve öt miRNS expresszióját elemeztük. Az öt miRNS az alábbiak voltak hsa-miR-22-3p (000398), hsa-miR-27a-3p (000408), hsa-miR-210-3p (000512), hsa-miR-320b (002844) és hsa-miR-375 (000564). Az adatok normalizálásához cel-miR-39 referenciát használtunk. Mind a reverz transzkripció, mind a valós idejű kvantitatív PCR a fent részletezett módon történt ebben a munkámban is.

3.4. Statisztikai elemzés

A nagy áteresztőképességű valós idejű PCR és mindkét munkámban a valós idejű egyedi kvantitatív PCR adatok statisztikai elemzését GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Ca, USA) szoftvert használtunk. A Shapiro-Wilk normalitás teszt eredménye alapján az ACA és az ACC csoport között eltérő expressziót mutató miRNS-eket Student féle T-próbával vagy Mann-Whitney teszttel elemeztük az első munkámban. Minden összehasonlításban a p -érték $< 0,05$ eredményt fogadtam el statisztikailag szignifikánsnak. Annak céljából, hogy olyan miRNS markert találjunk, amely a preoperatív diagnózisban alkalmazható lehet, Receiver Operating Characteristics (ROC) analízist hajtottunk végre GraphPad Prism 7.02 felhasználásával.

Második munkámban a miRNS-ek kifejeződésének különbözőségét a három csoportban Shapiro-Wilk normalitás teszt eredményétől függően egyutas variancia analízist (Analysis of Variance, one-way ANOVA) követő Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszttel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn teszttel elemeztük. Spearman korrelációt használtunk a miRNS $-dCT$ értékei illetve a bazális reggeli kortizol szint (nmol/l), a 24 órás gyűjtött vizelet szabad kortizol szint (nmol/24h) és a kortizol szint (nmol/l) kis dózisú dexametazon teszt közötti kapcsolat megítéléséhez. A klinikai diagnosztikai felhasználhatóság megítélése céljából ROC analízissel vizsgáltuk a hsa-miR-320b expresszióját CPA és CP-ACC között. A miRNS-ek kis dózisú dexametazon tesztet követő kifejeződésbeli változásának megítélése céljából a Shapiro-Wilk normalitás teszt után Student-féle T-próbát használtunk.

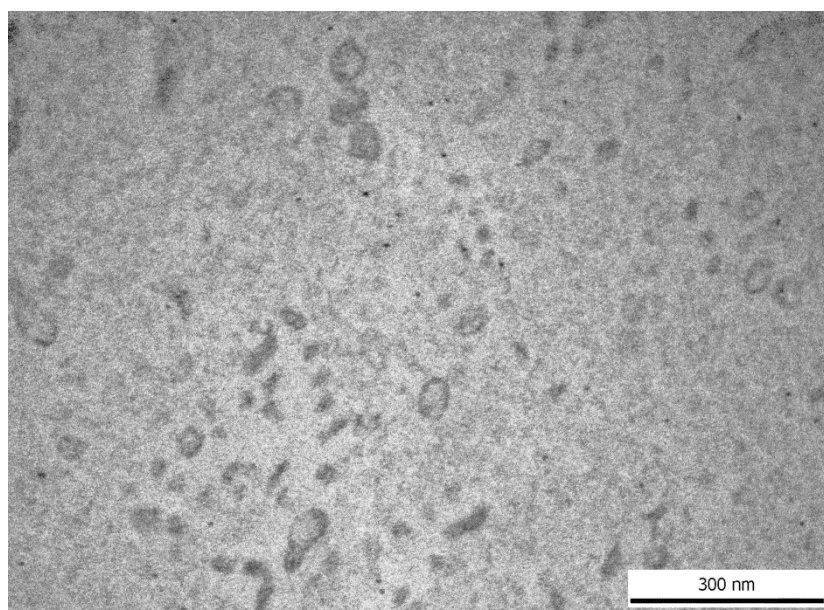
4. EREDMÉNYEK

4.1. Extracelluláris vezikulák jellemzése

4.1.1. Extracelluláris vezikulák vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

Első munkámban transzmissziós elektronmikroszkóppal és áramlási citometriával is igazoltuk az EV-k jelenlétét a mintákban. Ezzel a két módszerrel eleget tettünk az extracelluláris vezikulák vizsgálatához szükséges alapvető kísérleti követelményeknek is [183].

Az ultracentrifugálási módszerrel izolált EV-kről transzmissziós elektronmikroszkóppal készített mikrofényképek megerősítették, hogy az általunk izolált vezikulák az irodalomban leírt exoszómákra jellemző morfológiai és méretbeli jellemzőkkel rendelkeznek (**4. ábra**).

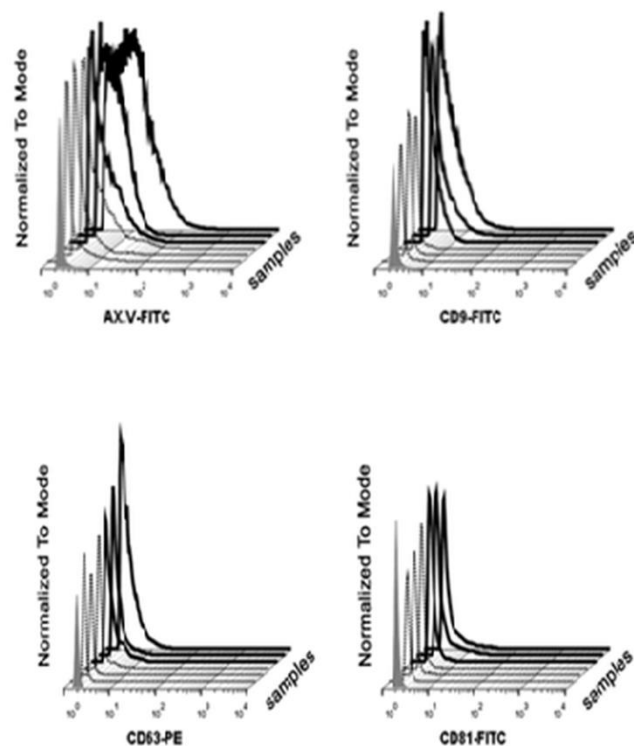


4. ábra: Humán vérplazma eredetű ultracentrifugálási módszerrel izolált extracelluláris vezikulák transzmissziós elektronmikroszkópos képe

Egyszeri mosás és RNáz emésztés után

4.1.2. Extracelluláris vezikulák felszíni markereinek kifejeződésének elemzése áramlási citometriával

Ultracentrifugálási módszerrel izolált EV-k áramlási citometriai vizsgálatával igazolni tudtuk a CD9, CD63 és CD81 membránfehérjék és az annexin V citoszolikus fehérje jelenlétét (**5. ábra**). A Total Exosome Isolation Kit (from plasma) felhasználásával izolált EV-k esetén a CD9, CD81 és annexin V kifejeződését tudtuk azonosítani (**5. ábra**).



5. ábra: A vérelemezmentes vérplazma latex gyöngyhöz kötött extracelluláris vezikula felszíni markereinek áramlási citometriai vizsgálata

Az EV-kat Total Exosome Isolation (from plasma) Kit (Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (üres hisztogramok pontozott vonallal) vagy 100000xg történt ultracentrifugálási módszerrel (üres hisztogramok folyamatos vonallal) izoláltuk három-három vérplazma mintából. A BSA-hoz kötött latex gyöngyökhöz kapcsolódó ellenanyagot a szürke hisztogram mutatja.

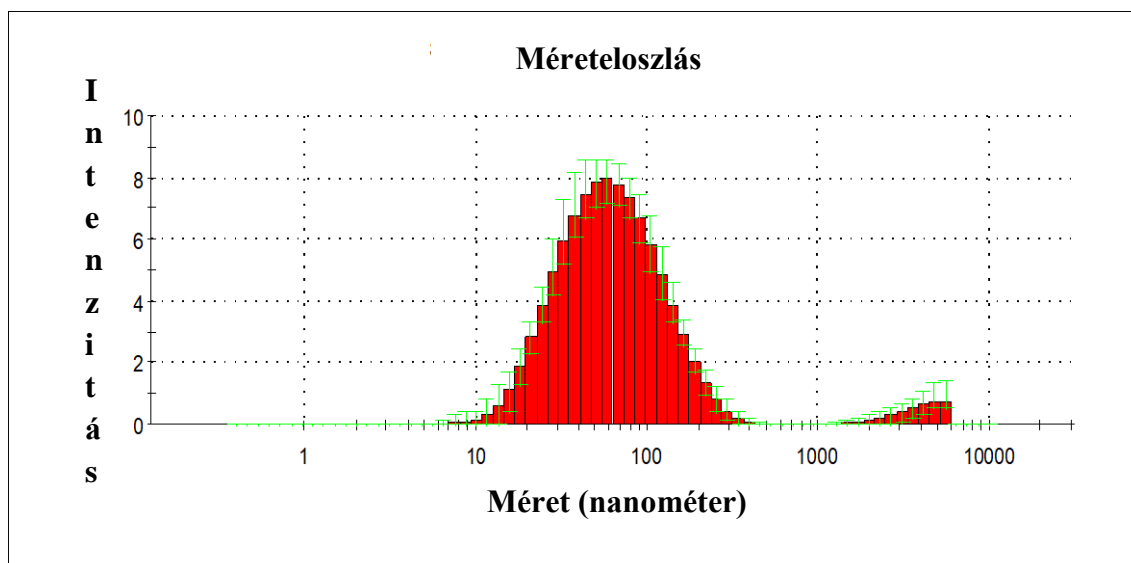
4.1.3. Az extracelluláris vezikulák méreteloszlásának meghatározása dinamikus fényszórás méréssel

Az extracelluláris vezikulák méreteloszlásának meghatározásához dinamikus fényszórásmérés technikát alkalmaztunk. Összesen 4 mintát elemeztünk, amelyeket Total Exosome Isolation Kit (from plasma) felhasználásával izoláltunk. A Z-átlagérték a 4 mintában $80,83 \pm 19,07$ nm volt PBS-ben oldva $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A részletes dinamikus fényszórásmérés eredményeket az **6. táblázat** foglalja össze. A 4. számú EV minta reprezentatív méreteloszlását az **6. ábra** mutatja be.

6. táblázat: A dinamikus fényszórásmérés eredménye

PDI: polidiszperzitási index, SD: szórás

Minta sorszám	PDI \pm SD	Z-átlag \pm SD (átmérő nm)	Intenzitás (átmérő nm) \pm SD
Minta 1	$0,21 \pm 0,01$	$97 \pm 1,06$	$122,9 \pm 1,77$
Minta 2	$0,2 \pm 0,01$	$98,6 \pm 0,76$	$124,1 \pm 2,77$
Minta 3	$0,25 \pm 0,01$	$62,8 \pm 0,77$	$85,9 \pm 1,85$
Minta 4	$0,26 \pm 0,01$	$65 \pm 0,3$	$90,8 \pm 2,45$



6. ábra: Reprezentatív ábra a 4. számú EV minta méreteloszlásáról.

Az y tengely a vezikula fényszórásintenzitást mutatja százalékban kifejezve, az x tengely a vezikula méretet nanométerben kifejezve. Az EV-k mérete 16-255 nm mérettartományban helyezkedett el (átmérő [átlag \pm SD], $90,08 \pm 2,45$)

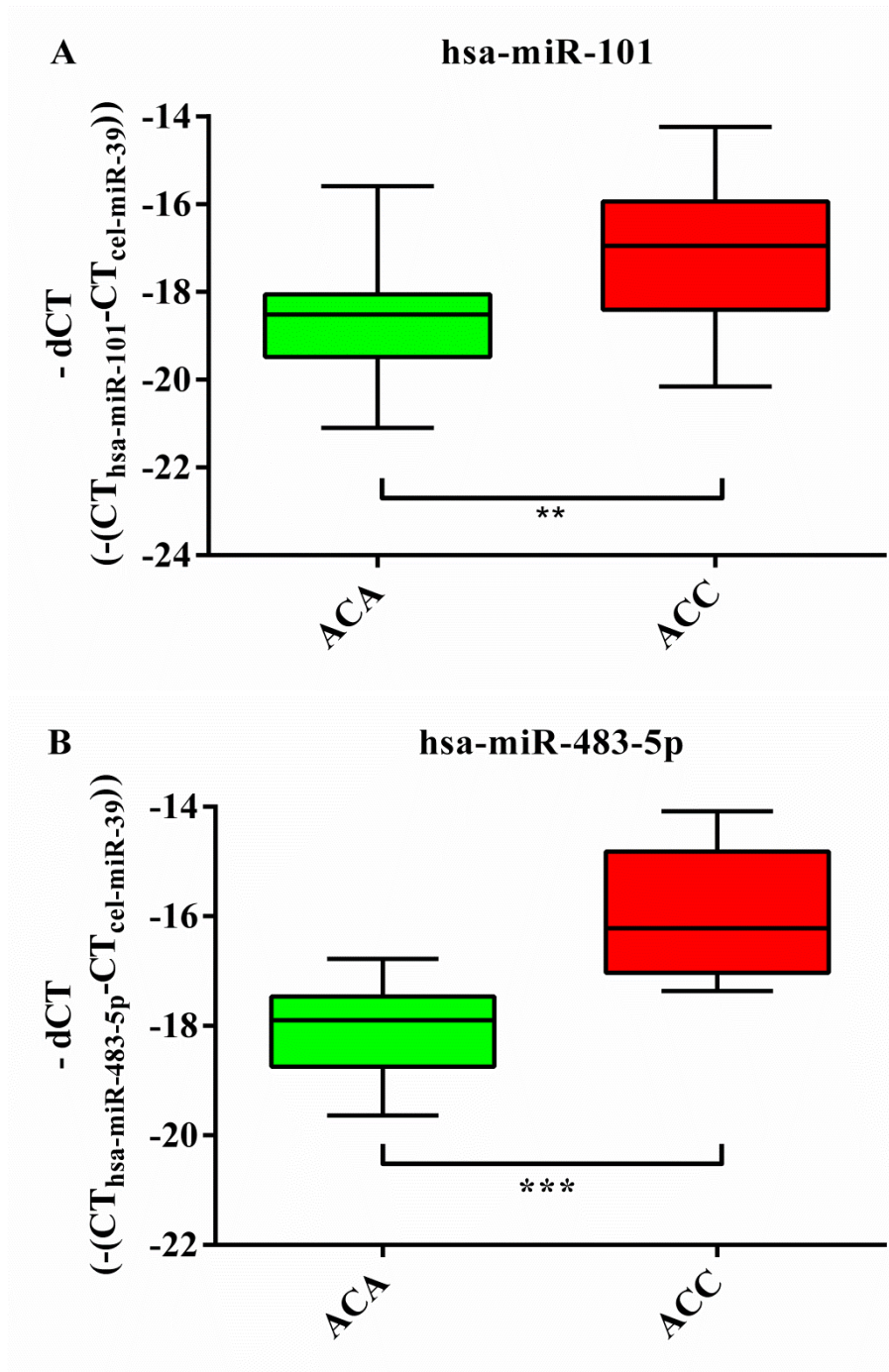
4.2. EV-asszociált miRNS expressziós mintázat vizsgálata mellékvesekéreg daganatokban

12 preoperatív plazma EV minta miRNS expressziós profilját TaqMan Array Human MicroRNA A kártyával elemeztük (n=6 ACA, n=6 ACC), annak céljából, hogy különböző kifejeződésű keringő EV-asszociált miRNS-eket azonosítsunk ACC és ACA mintákban. A módszer mintánként összesen 377 emberi miRNS kifejeződésének párhuzamos mérését tette lehetővé. A módszerek fejezetnél (III.3.2.) részletezett statisztikai elemzéssel és Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával nem találtunk olyan miRNS-t, ami szignifikáns mértékben eltért volna a két csoportban. Ugyanakkor a TLDA-kártyát csak felfedező jelleggel, limitált esetszámú minta miRNS profiljának meghatározása céljából használtuk. Összesen 32 olyan miRNS-t azonosítottunk, melyek mind a 12 mintában kifejeződtek. Nem találtunk olyan miRNS-t, amely vagy csak ACC-ban vagy csak ACA-ban fejeződött volna ki. Fischer-féle exakt teszt használatával- azon miRNS-ek között, amelyek nem expresszálódtak az összes mintában- két olyan miRNS-t találtunk, amely tendenciózus mértékben eltérő kifejeződést mutatott a két csoport között. Ezt a két miRNS-t: a hsa-miR-101-t és a hsa-miR-483-5p-t választottuk ki további célzott validáció céljára. A hsa-miR-101 egy ACA-ban (1/6 ACA) és öt ACC (5/6 ACC) mintában fejeződött ki. A hsa-miR-483-5p kettő ACA-ban (2/6 ACA) és mind a hat ACC-ben expresszálódott.

4.3. A miRNS expresszió vizsgálata RT-qPCR módszerrel

4.3.1. Mellékvesekéreg-adenoma és carcinoma összehasonlítása

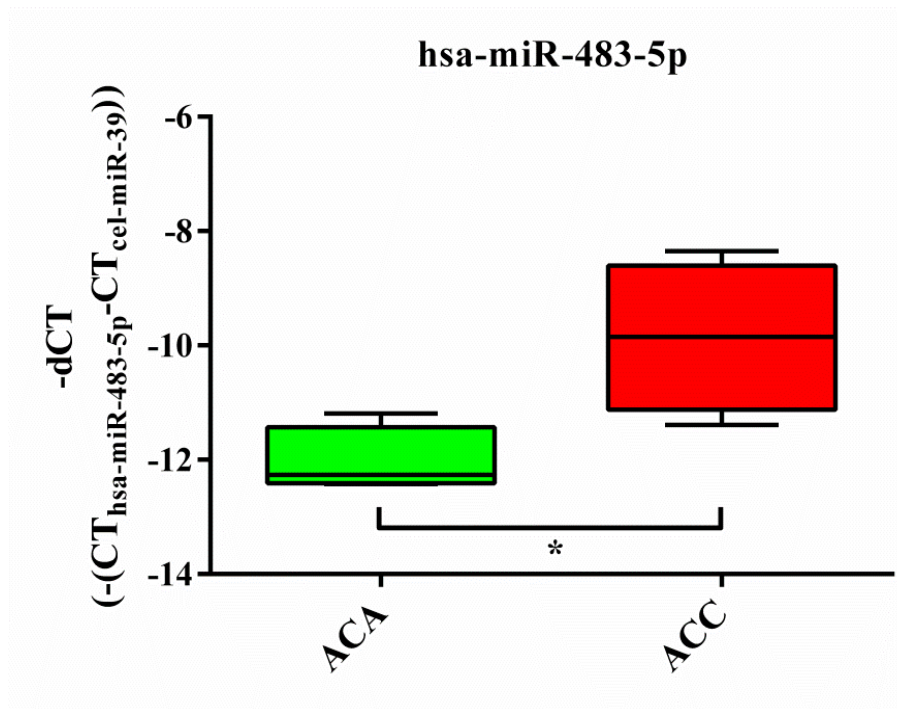
Első munkámban a megerősítő kohorsz 18 ACA-ban és 16 ACC-ben szenvedő beteg preoperatív plazmamintájából állt. Ebben az esetben az EV-asszociált miRNS-ek a Total Exosome RNA and Protein Isolation Kittel (Thermo Fisher Scientific) izoláltuk. A keringő miRNS kutatásokban az egyik leggyakrabban alkalmazott szintetikus spike-in kontrollt, a cel-miR-39-et használtuk referenciaként [139, 149, 186, 187]. Két miRNS esetén szignifikánsan magasabb kifejeződési értéket találtunk preoperatív ACC plazma EV mintákban ACA mintákhoz viszonyítva. Student-féle T-teszttel a szignifikancia szint hsa-miR-101 esetén $p=0,0052$ -nek (**7. ábra**), míg hsa-miR-483-5p esetén $p<0,0001$ -nek adódott (**7. ábra**).



7. ábra: A RT-qPCR módszerrel validált miRNS-ek expressziós mintázata mellékvesekéreg daganatokban

(A) *hsa-miR-101* expressziója $-\text{dCT}$ -ben kifejezve ACA és ACC csoportban (B) *hsa-miR-483-5p* expressziója $-\text{dCT}$ -ben kifejezve ACA és ACC csoportban. Referencia *cel-miR-39* (átlag \pm SD, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Student-féle T-próba, $n = 18$ ACA, $n = 16$ ACC).

A hsa-miR-483-5p kifejeződését ultracentrifugával izolált EV-k esetén is elemeztük. Ezzel a protokollal 4 ACA és 4 ACC-ben szenvedő beteg plazmamintáit hasonlítottuk össze. Az adatok normalizálásához ebben az esetben is a cel-miR-39 referenciát használtuk. A hsa-miR-483-5p kifejeződését szignifikánsan magasabbnak találtuk az ACC-s betegcsoportban az ACA-hoz viszonyítva ($p=0,0221$) (8. ábra)



8. ábra: Ultracentrifugával izolált EV-eredetű hsa-miR-483-5p kifejeződésének vizsgálata ACA-ban és ACC-ban RT-qPCR módszerrel. Referencia cel-miR-39-hez normalizálva.

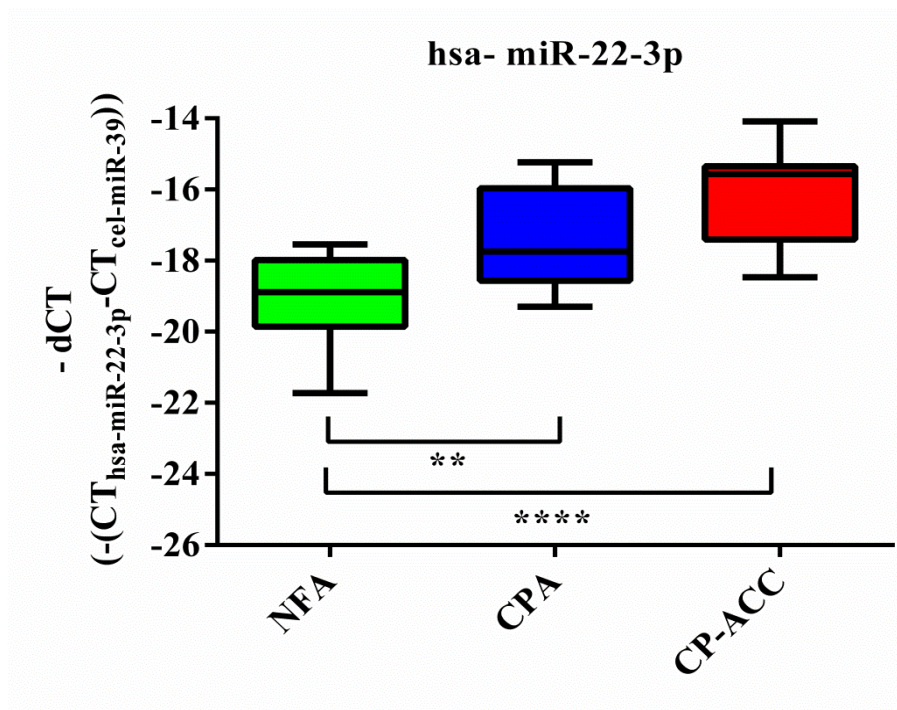
*Az eredmény $-dCT$ (cycle threshold) módszerrel van ábrázolva. (Átlag \pm szórás, $*p < 0,05$; Student-féle t -próba, $n = 4$ ACA, $n = 4$ ACC).*

4.3.2. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomák és kortizoltermelő jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok összehasonlítása

Második munkámban a plazma EV-eredetű miRNS-ek kifejeződését vizsgáltam hormonálisan inaktív ACA-ban ($n=13$, NFA), kortizoltermelő ACA-ban ($n=13$, CPA) és kortizoltermelő ACC-ban ($n=9$, CP-ACC). 5 miRNS expresszióját elemeztük

munkacsoportunk korábbi kutatásai és irodalmi adatok alapján [4][113][188]. Normalizáláshoz az általánosan alkalmazott cel-miR-39-et használtuk referenciaként.

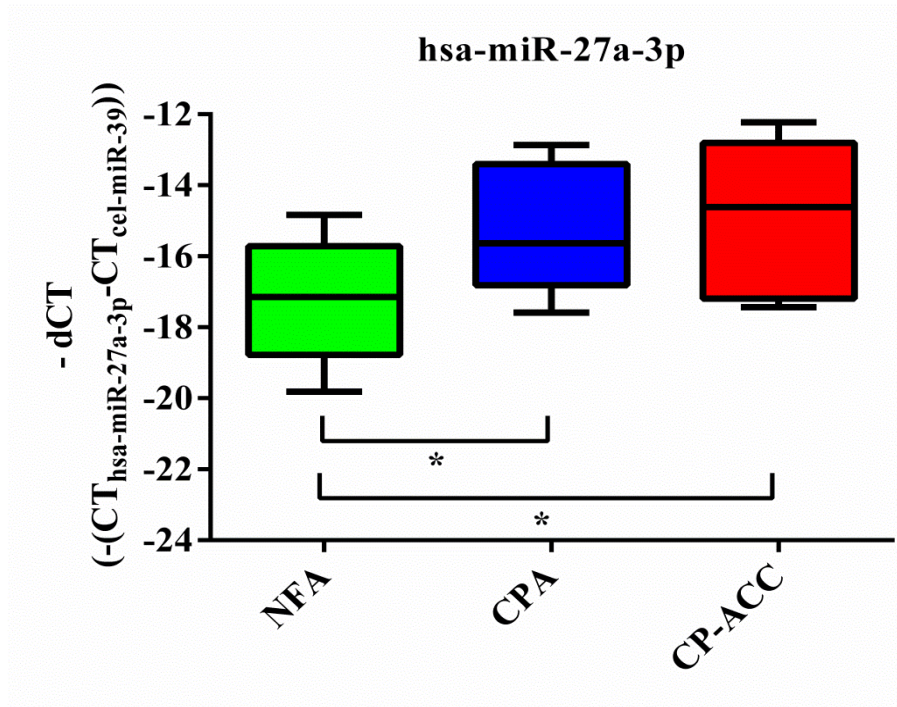
Szignifikáns mértékű alulexpresszáldást találtunk hsa-miR-22-3p esetén NFA és CPA között (fold change (FC)=3,21; $p < 0.01$) (9. ábra), továbbá NFA és CP-ACC összehasonlítása esetén (FC=7,34; $p < 0,0001$) (9. ábra). Nem találtunk szignifikáns eltérést CPA és CP-ACC között (9. ábra).



9. ábra: A hsa-miR-22-3p expressziójának elemzése RT-qPCR módszerrel mellékvesekéreg daganatokban. Referencia cel-miR-39-hez normalizálva.

*Az eredmény $-dCT$ (cycle threshold) módszerrel van ábrázolva. NFA: nem-funkcionáló adenoma ($n=13$), CPA: kortizoltermelő adenoma ($n=13$), CP-ACC: kortizoltermelő carcinoma ($n=9$) (Átlag \pm szórás, $**p < 0.01$; $****p < 0,0001$, egyutas variancia analízist követő Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt).*

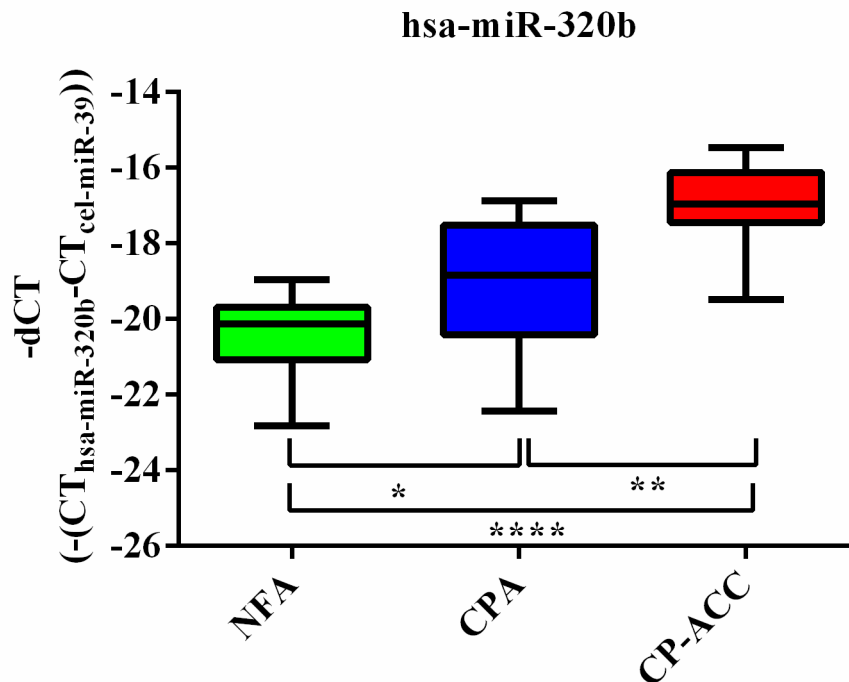
A hsa-miR-27a-3p szignifikánsan kisebb mértékben fejeződött ki NFA-ban a kortizoltermelő daganatokhoz viszonyítva, mind CPA-hoz képest (FC=3,55; $p<0,05$), mind CP-ACC-hez viszonyítva (FC=4,59; $p<0,05$) (10. ábra).



10. ábra: hsa-miR-27a-3p expressziójának elemzése RT-qPCR módszerrel mellékvesekéreg daganatokban. Referencia cel-miR-39-hez normalizálva.

*Az eredmény $-dCT$ (cycle threshold) módszerrel van ábrázolva. NFA: nem-funkcionáló adenoma ($n=13$), CPA: kortizoltermelő adenoma ($n=13$), CP-ACC: kortizoltermelő carcinoma ($n=9$) (Átlag \pm szórás, $*p < 0,05$; egyutas variancia analízist követő Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt).*

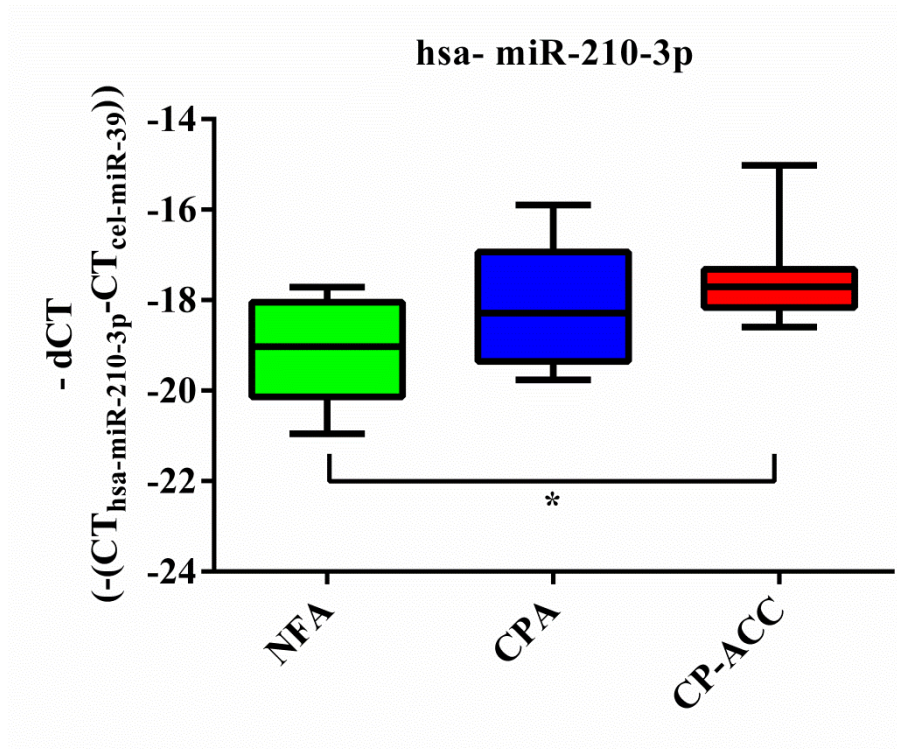
A hsa-miR-320b szignifikánsan magasabb expresszióját igazoltuk - a CP-ACC (FC=10,88 $p < 0,0001$) és CPA csoportban (FC=2,57 $p < 0,05$) NFA-hoz viszonyítva. Továbbá CP-ACC-ben is szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kifejeződése CPA-hoz viszonyítva ($p < 0,01$) (11. ábra).



11. ábra: hsa-miR-320b expressziójának elemzése RT-qPCR módszerrel mellékvesekéreg daganatokban. Referencia cel-miR-39-hez normalizálva.

*Az eredmény $-dCT$ (cycle threshold) módszerrel van ábrázolva. NFA: nem-funkcionáló adenoma ($n=13$), CPA: kortizoltermelő adenoma ($n=13$), CP-ACC: kortizoltermelő carcinoma ($n=9$) (Átlag \pm szórás, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; egyutas variancia analízist követő Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt).*

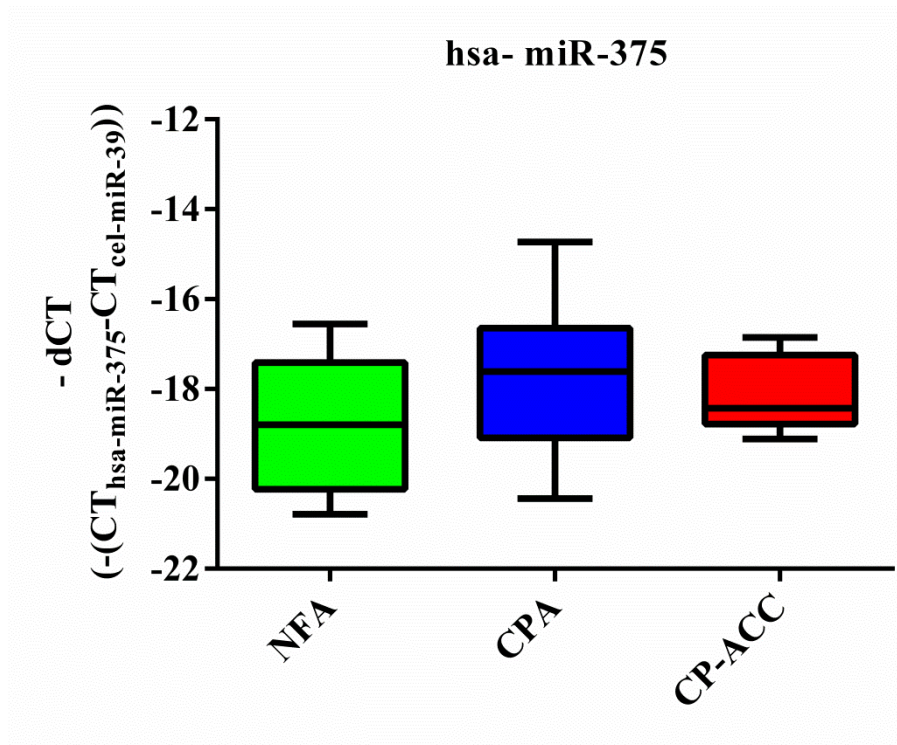
Hsa-miR-210-3p tekintetében csak a CP-ACC csoportban tudtunk szignifikáns mértékű felülexpresszáldást kimutatni NFA-hoz viszonyítva (FC=3,1 $p < 0,05$) (12. ábra).



12. ábra: A hsa-miR-210-3p expressziójának elemzése RT-qPCR módszerrel mellékvesekéreg daganatokban. Referencia cel-miR-39-hez normalizálva.

*Az eredmény $-dCT$ (cycle threshold) módszerrel van ábrázolva. NFA: nem-funkcionáló adenoma ($n=13$), CPA: kortizoltermelő adenoma ($n=13$), CP-ACC: kortizoltermelő carcinoma ($n=9$) (Átlag \pm szórás, $*p < 0,05$; Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn-féle multiple comparisons poszt-hoc teszt).*

Nem találtunk szignifikáns kifejeződésbeli eltérést a hsa-miR-375-nek a három vizsgált daganatcsoport között (**13. ábra**). Szintén nem észleltünk érdemi eltérést a férfi és női betegek miRNS expressziójában a CP-ACC csoportban.

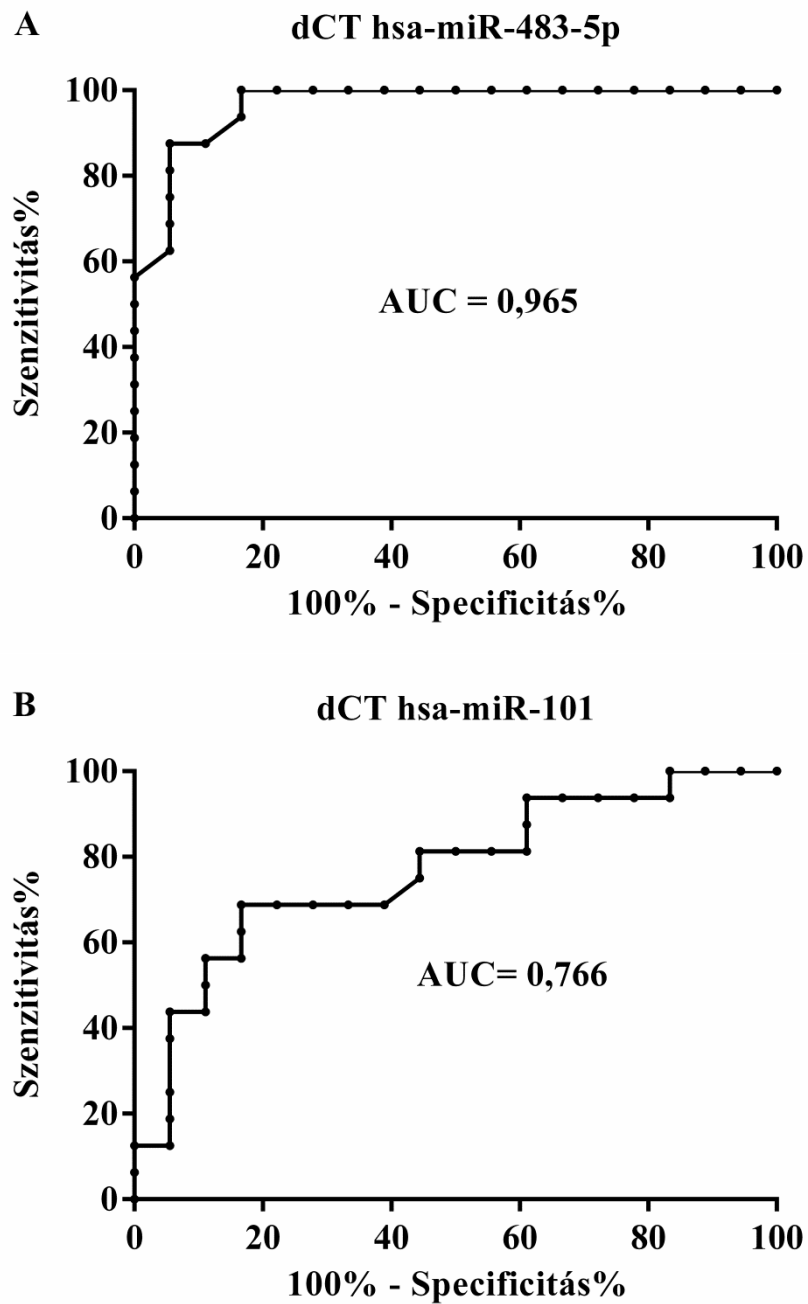


13. ábra: A hsa-miR-375 expressziójának elemzése RT-qPCR módszerrel mellékvesekéreg daganatokban. Referencia cel-miR-39-hez normalizálva.

Az eredmény $-dCT$ (cycle threshold) módszerrel van ábrázolva. NFA: nem-funkcionáló adenoma ($n=13$), CPA: kortizoltermelő adenoma ($n=13$), CP-ACC: kortizoltermelő carcinoma ($n=9$) (Átlag \pm szórás; egyutas variancia analízist követő Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt).

4.4. A mellékvesekéreg daganatok malignitásának jelzésére alkalmas minimálisan invazív biomarker miRNS-ek vizsgálata ROC-analízissel

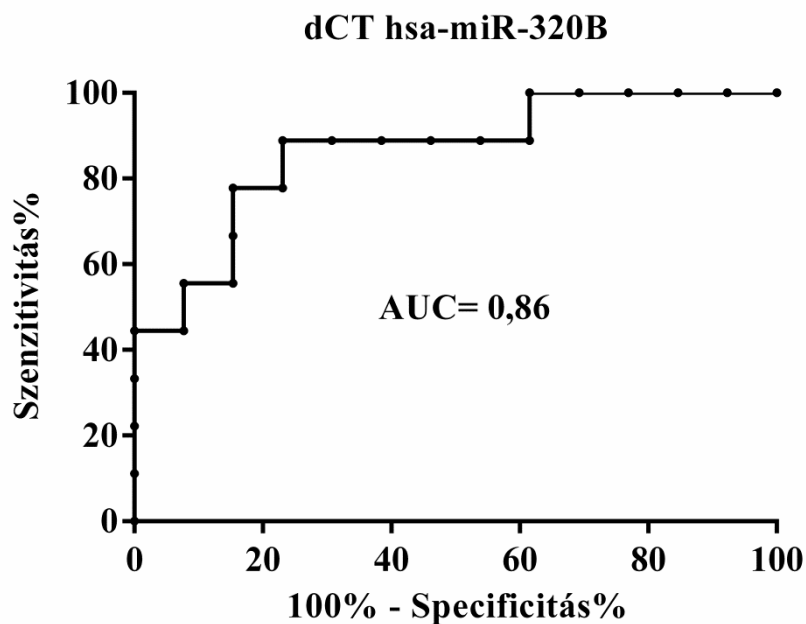
Első munkámban ROC analízissel vizsgáltuk az EV-asszociált miRNS-ek potenciális alkalmazhatóságát minimálisan invazív biomarkerként a malignitás előrejelzésére mellékvesekéreg daganatokban. E célból az RT-qPCR módszerrel validált ACC-ban szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-eket (hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p) vizsgáltuk. Referenciaként a spike-in kontroll cel-miR-39-et használtuk mind a hsa-miR-101, mind a hsa-miR-483-5p esetén. A $dCT_{hsa-miR-483-5p}$ a cel-miR-39 referenciához normalizálva mutatta a legnagyobb görbe alatti területet: (Area under curve=AUC) 0,965. A küszöbértéket 17,25-re állítva a teszt szenzitivitása 87,5 %, míg a specificitása 94,44 % volt az ACA és ACC megkülönböztetésében (**14. ábra**). A hsa-miR-101 esetén a ROC elemzéssel nem adódott kellően magas szenzitivitási és specificitási érték. A küszöbértéket 17,82-re állítva, az AUC 0,766 volt, míg a szenzitivitás 68,75% és a specificitás 83,33% volt (**14. ábra**).



14. ábra: A mellékvesekéreg carcinóma elkülönítésére legalkalmasabbnak talált miRNS biomarkerek Receiver Operating Characteristics (ROC) görbéi.

RT-qPCR analízise ACA (n=18) és ACC (n=16) EV-eredetű miRNS-ek kifejeződésének dCT módszerrel (delta cycle threshold) cel-miR-39 housekeeping referenciához normalizálva. AUC: ROC görbe alatti terület (Area under the curve) A: hsa-miR-483-5p ROC analízise; B: hsa-miR-101 ROC analízise.

Második munkámban ROC analízissel vizsgáltam a hsa-miR-320b diagnosztikai hatékonyságát CPA és CP-ACC elkülönítésére. A klinikai alkalmazhatósághoz nem találtunk kellően magas szenzitivitási (88,89%) és specificitási (76,92%) értéket. A görbe alatti terület 0,8632-nak adódott (**15. ábra**). A küszöbértéket 17,53-as értéknél húztuk meg.



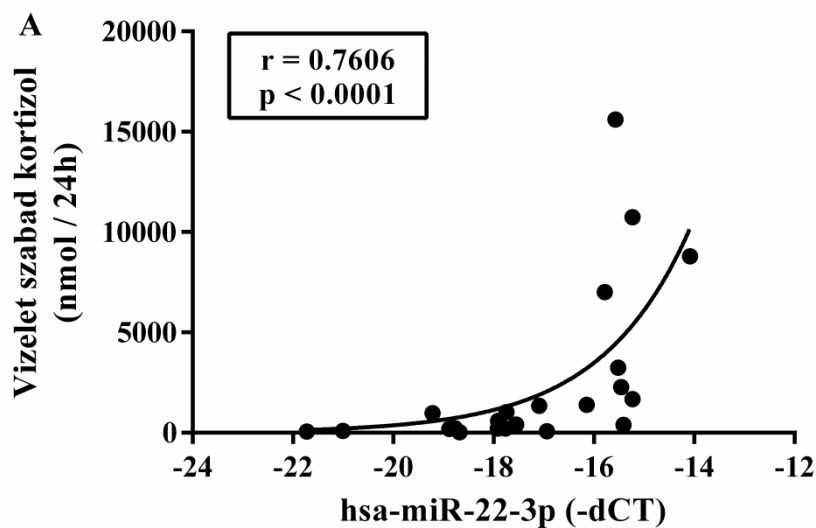
15. ábra: Kortizoltermelő mellékvesekéreg adenoma és carcinóma elkülönítésére legalkalmasabbnak talált miRNS biomarker Receiver Operating Characteristics (ROC) görbéje.

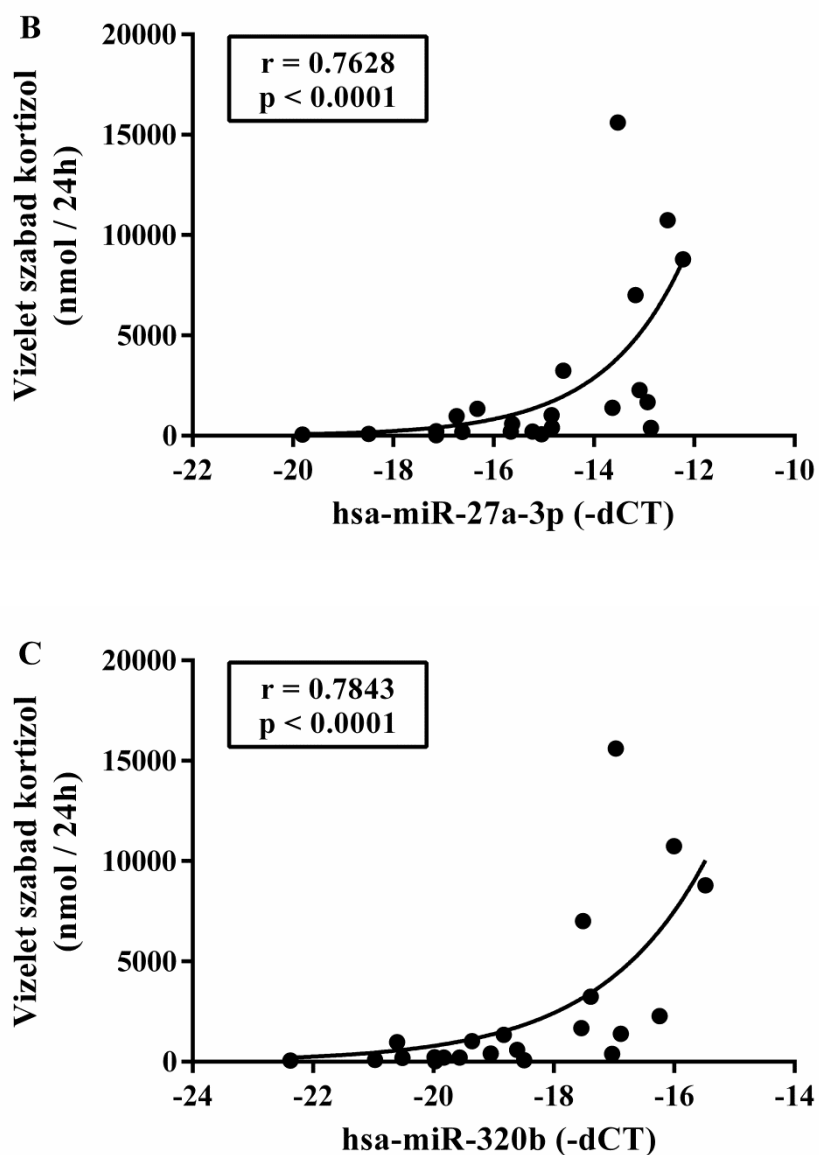
RT-qPCR analízise CPA (n=13) és CP-ACC (n=9) EV-eredetű hsa-miR-320b kifejeződésének dCT módszerrel (delta cycle threshold) cel-miR-39 housekeeping referenciához normalizálva. AUC: ROC görbe alatti terület (Area under the curve).

4.5. Keringő EV-asszociált miRNS expresszió és kortizolszekréciós paraméterek közötti korreláció vizsgálata

Spearman-korrelációs vizsgálattal elemeztük a keringő miRNS (-dCT) és kortizolszekréciós paraméterek közötti kapcsolatot. Ezek alapján nem találtunk kapcsolatot a bazális kortizol szint (nmol/l; 30/35 eset) és a miRNS-ek kifejeződése között. Szignifikáns kapcsolatot tudtunk azonban igazolni a vizelet szabad kortizol (nmol/24h; 22/35 eset) szintje és a hsa-miR-22-3p ($r=0,7606$; $p<0,0001$) (**16. ábra**), a hsa-miR-27a-3p ($r=0,7628$; $p<0,0001$) (**16. ábra**) és a hsa-miR-320b expressziója között ($r=0,7843$; $p<0,0001$) (**16. ábra**).

Ezenkívül szignifikáns korrelációt mutattunk ki a kis dózisú dexametazon teszt (LDDT) utáni kortizol koncentráció (nmol/l; 17/35 eset) és a hsa-miR-22-3p ($p=0,0237$) illetve a hsa-miR-320b ($p=0,0216$) expressziója között.



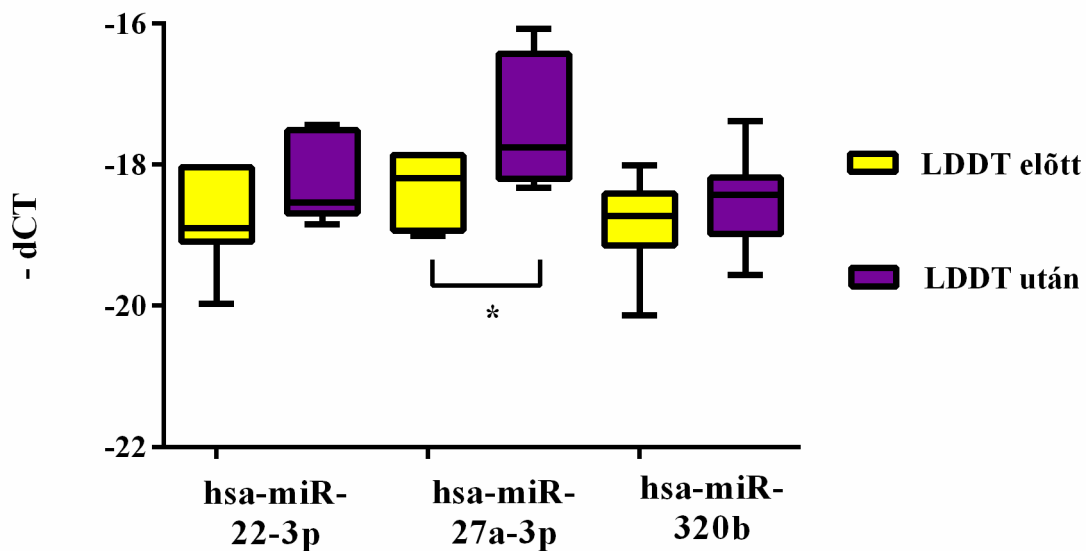


16. ábra: Vizelet szabad kortizol szintje és miRNS expresszió közötti korreláció vizsgálata

Vizelet szabad kortizol (nmol/l) és mikroRNS expresszió (-dCT) közötti korreláció Spearman-korrelációs elemzéssel Shapiro-Wilk normalitás teszt után. A: hsa-miR-22-3p, B: hsa-miR-27a-3p, C: hsa-miR-320b.

4.6. A kis dózisú dexametazon teszt miRNS-ek expresszióját befolyásoló hatásának vizsgálata

Munkacsoportunk korábbi vizsgálata során a mikroRNS expresszió esetleges változásait tanulmányozta kis dózisú dexametazon teszt és ACTH-stimulációs teszt során ép hypothalamus-hypophysis–mellékvese tengellyel rendelkező egyénekben [188]. E plazmamintákat újra vizsgáltuk három EV-eredetű miRNS-ek vizsgálata céljából. 7 normálisan működő hypothalamus-hypophysis–mellékvese tengellyel rendelkező páciensnél LDDT előtt és után. Ezek alapján az EV-eredetű hsa-miR-27a-3p kifejeződését az 1 mg dexametazon szignifikánsan serkentette (**17. ábra**). Hsa-miR-22-3p és hsa-miR-320b esetén tendenciózus, a szignifikancia határát nem elérő változást találtunk.



17. ábra: MikroRNS expresszió változás kis dózisú (1mg) dexametazon hatására

*Hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p és hsa-miR-320b expresszió változása 1 mg dexametazon hatására. Referencia cel-miR-39-hez viszonyítva (átlag±SD, * $p < 0,05$; $n=7$, Student-féle t -teszt Shapiro-Wilk normalitás tesztet követően).*

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. EV-asszociált miRNS-ek expressziós mintázatának és diagnosztikus hatékonyságának vizsgálata mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganataiban

A keringő miRNS-ek minimálisan invazív biomarkerként alkalmasak lehetnek egyes daganatok diagnózisának felállításában [139, 175, 189]. Munkacsoportunk korábban teljes plazmából izolált 5 miRNS esetén (hsa-miR-100, hsa-miR-181b, hsa-miR-184, hsa-miR-210 és hsa-miR-483-5p) szignifikánsabb magasabb expressziót mutatott ki rosszindulatú mellékvesekéreg-tumorban adenomához viszonyítva. E miRNS expressziós értékek ROC analízise alapján, a hsa-miR-100 és a hsa-miR-181b expressziójának arányát felhasználva 77,8 %-os szenzitivitás és 100%-os specificitás volt elérhető, míg hsa-miR-210 és hsa-miR-181b kifejeződésének különbségét elemezve 88,9 %-os szenzitivitással és 75 %-os specificitással volt elkülöníthető a mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganata [179]. Két további kutatás elemezte a keringő miRNS-ek expresszióját mellékvesekéreg-daganatos betegek vérérszérumában [180, 181]. Mindkét vizsgálat kimutatta a hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszáldását ACC-ben ACA-hoz viszonyítva. Patel és mtsai ezenkívül a hsa-miR-34a fokozott kifejeződését [181], míg Chabre és mtsai a hsa-miR-195 és a hsa-miR-335 csökkent expresszióját találták a rosszindulatú betegcsoportban adenomához képest [180]. Mindazonáltal egyik vizsgálat sem volt képes a klinikai gyakorlatban alkalmazható kellően magas szenzitivitási és specificitási értékkel elkülöníteni a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatot.

Több tanulmány is leírta, hogy az aktívan szecernált extracelluláris vezikulák miRNS profilja jelentős eltérést mutat a donor sejthez képest [146, 156, 159, 160]. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az EV-eredetű miRNS-ek érzékenyebb és specifikusabb markerek lehetnek a szervezetben kialakuló patológias állapotoknak, mint a teljes plazma- illetve szérum eredetűek.

Vizsgálataink során célul tűztük ki az EV-asszociált miRNS-ek expressziójának és potenciális diagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálatát mellékvesekéreg-daganatban szenvedő betegek vérmintáiban. Legjobb tudomásunk szerint az EV-eredetű miRNS-ek kifejeződését ezen daganatokban munkacsoportunk vizsgálta és publikálta először.

Jelen munkámban sikeresen mutattam ki a megerősítő kohorszban az EV-eredetű hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszáldását ACC betegek plazmamintájában ACA csoporthoz viszonyítva. A keringő EV-eredetű hsa-miR-483-5p esetében, kellően magas görbe alatti terület, szenzitivitási és specificitási értéket tudtunk elérni, ami a klinikai alkalmazás lehetőségét vetítheti előre. Így e miRNS potenciális minimálisan invazív biomarkere lehet a mellékvesekéreg rosszindulatú daganatának. A hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékben fokozott kifejeződését ACC mintákban, abban az esetben is ki tudtuk mutatni, ha az EV-kat különféle centrifugálási/ultracentrifugálási módszerekkel izoláltuk, ami megerősíti az általunk izolált miRNS-ek EV-eredetét.

A keringő miRNS vizsgálati adatok normalizáláshoz alkalmazható általánosan elfogadott referenciagén még nem került leírásra a szakirodalomban [190]. Referenciaként leggyakrabban a kis nukleáris RNS U6-ot (snRNA U6), a hsa-miR-16-ot és a szintetikus, exogén spike-in kontroll cel-miR-39-et alkalmazzák [190]. Mindhárom fent említett kontroll, azonban jelentős alkalmazhatósági limittel rendelkezik. Az

snRNA U6 expressziója jelentős varianciát mutat az egyének között [191]. Korábbi teljes plazmából izolált miRNS vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a hsa-miR-16 és a cel-miR-39 is alkalmas referencia lehet az adatok normalizálásához [179]. Jelen munkáim során a cel-miR-39 szintetikus spike-in kontrollt alkalmaztuk [139, 149]. Tekintettel arra, hogy a TLDA A kártya nem tartalmazta a cel-miR-39-et, így a felfedező kohorszban nem tudtuk e miRNS-t alkalmazni. Habár a cel-miR-39 nem tekinthető egyértelműen megfelelő biológiai kontrollnak, de a miRNS izolálás hatékonyságának jelzésére is alkalmas [179, 190].

Több tanulmány is leírta már e két miRNS jelentőségét különféle élettani és kóreltani folyamatokban. A hsa-miR-483-5p fokozott kifejeződését mind szöveti szinten, mind keringő, vérben előforduló formában is megerősítették ACC-ban szenvedő betegek mintáiban [167, 168, 181]. Génje az IGF2 gén második intronjában helyezkedik el, ami az egyik leggyakrabban felülexpresszált gén mellékvesekéreg daganatban [176]. Bár a hsa-miR-483-5p pontos hatásmechanizmusát nem ismerjük még, érdemes megemlíteni, hogy mind az IGF2, mind a saját expresszióját képes fokozni bizonyos *in vitro* körülmények között [141, 192, 193]. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatában leírta, hogy sem a dexametazon, sem az ACTH-val végrehajott kezelés nem befolyásolja érdemben a kifejeződését. A hormonális diagnosztikus tesztekkel szembeni érzéketlenség tovább erősíti a potenciális biomarker szerepét az ACC preoperatív diagnosztikájában [188]. Egyes eredmények alapján fontos prognosztikai szerepe is lehet mellékvesekéreg daganatokban, mivel fokozott kifejeződése rossz prognózissal és a rák kiújulásának fokozott kockázatával jár [180]. Ezen kívül még prosztatákban is ismert a sejtosztódást fokozó hatása, amelyet a Wnt/ β -katenin jelátviteli úton fejt ki [194]. Szintén ezen a jelátviteli úton keresztül fokozza a sejtek migrációját tüdő

adenocarcinomában [195]. A Wnt/ β -katenin útvonalon betöltött szerepe ACC-ben egyelőre még nem bizonyított.

Legjobb tudomásunk szerint eddig csak munkacsoportunk írta le a hsa-miR-101 fokozott kifejeződését mellékvesekéreg-rákban. Rosszindulatú phaeochromocytomában (PCC) ugyanakkor már korábban is ismert volt a fokozott expressziója a PCC jóindulatú formájához viszonyítva [196]. Más daganatokban azonban tumorszuppresszor szerepet tölt be. Ide tartoznak többek között a gyomor [197], vastag- és végbél [198], illetve a prosztata daganatai [199]. A miRNS szövetspecifikus hatásait ismerve ez a kettőség azonban nem újdonság. Egyazon miRNS-nek onkogén vagy tumor szuppresszor funkciója is lehet a különböző szervekben [200].

Munkacsoportunk korábbi munkájában teljes plazma eredetű miRNS expresszióját vizsgáltuk és összesen öt ACC-ben szignifikánsan felülexpresszáladó miRNS-t találtunk ACA-hoz viszonyítva [179]. Tekintve, hogy ezen miRNS-ek célzottan kerültek kiválasztásra korábbi irodalmi adatok alapján, így elképzelhető, hogy teljes plazmában az eltérően kifejeződő miRNS-ek száma még ennél is magasabb lehet. Jelen munkámban ugyanakkor csak 2 miRNS-t tudtunk validálni a két csoport között, ami felveti, hogy az EV-eredetű miRNS-ek mellékvesekéreg specifikusabbak, így a diagnosztikában jobban alkalmazhatóak lehetnek, mint a teljes plazma eredetűek.

5.2. A „kit”-tel izolált EV preparátumok és az ultracentrifugálási protokoll alkalmazásával nyert EV-preparátumok összevetése

A minimális EV kutatási követelményeknek eleget téve és a Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával izolált EV-eredetű miRNS-ek expressziójának eredményének megerősítése céljából az EV-kat különféle centrifugálási/ultracentrifugálási módszerrel is izoláltunk. Az EV preparátumokat továbbá transzmissziós elektronmikroszkóppal és áramlási citometriával is vizsgáltuk [183]. Jelenleg az EV izolálás arany standard módszere az ultracentrifugálás [183, 201]. A transzmissziós elektronmikroszkópot alkalmazva egyidejűleg van lehetőség az EV-k méret és morfológiai tulajdonságainak vizsgálatára [157]. Áramlási citometriával mind a kit, mind az UC-val izolált EV-k esetén ki tudtuk mutatni az annexin V, CD9 és CD81 jelenlétét. Az annexin V és a tetraspanin CD9, CD63 és CD 81 az EV-k közül elsősorban az exoszómák jellegzetes markerei [157, 202]. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy mind a kétféle izolálási módszerrel (kit és UC) izolált preparátumok nagyszámban tartalmaztak EV-kat. Az exoszómákra jellemző tetraspanin és annexin V jelenlétének kimutatása alapján az is kijelenthető, hogy a minták nem csak EV-kat, hanem döntő többségben exoszómákat tartalmaztak [157]. Ezen megfigyelésünket az EV-k méreteloszlásának meghatározása is megerősítette. Ugyanakkor, jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan általánosan elfogadott univerzális marker, mely egyértelműen el tudná a különíteni a mikrovezikulákat az exoszómáktól. Így az általunk izolált preparátumokra a disszertációban összefoglalóan EV-ként hivatkozom, és nem, mint exoszóma, vagy mikrovezikula. Az UC módszerrel izolált EV-k esetén a CD9 és CD81 expressziója magasabb volt, mint a kit által izolált minták esetén. A CD63 expressziója csak az UC módszerrel nyert preparátumok esetén volt kimutatható. Ezen eltérések

hátterében a kiindulási plazma mennyiségek különbsége is állhat. Míg UC esetén 3 ml, addig a kittel történő izoláláshoz csak 200 µl humán plazma szükséges. Ugyanakkor az UC alapuló módszer nagy munka- és időigénnyel járó protokoll, ezáltal nehezen alkalmazható klinikai vizsgálatokra. Vizsgálataink során pedig célul tűztük ki egy olyan EV-izolálási módszer alkalmazását, amely a mindennapi klinikai gyakorlatban is felhasználható. Erre a célra, akár nagyobb esetszámú vizsgálatok esetén a kit megfelel, tekintve, hogy mindkét módszerrel, sikerrel tudtuk kimutatni a hsa-miR-483-5p felülexpresszáldást az ACC betegcsoportban.

Következtetesként levonható, hogy eredményeink alapján az EV-asszociált miRNS-ek reményteli preoperatív, minimálisan invazív biomarkerek lehetnek a mellékvesekéreg rosszindulatú daganatának diagnózisában. Munkánk során nagy áteresztőképességű módszert alkalmaztunk szűrésre, majd az ígéretes miRNS-ek expresszióját célzott RT-qPCR-el elemeztük nagyobb esetszámú kohorszokon. E módszer tűnik a legmegfelelőbbnek a keringő miRNS-ek kifejeződésének vizsgálatához [203]. Ugyanakkor a limitált esetszámú betegminták, az adatok normalizálásához általánosan elfogadott referenciagén hiánya, illetve a különböző tanulmányokban eltérő miRNS izolálási technikák miatt a vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása nehéz. Mindazonáltal jelen munkánkban, a klinikai gyakorlatban is alkalmazható, kellően magas szenzitivitási és specificitási értékkel tudtuk elkülöníteni a mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganatát.

5.3. EV-asszociált miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata hormonálisan inaktív és kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban

A keringő miRNS-ek kifejeződését már vizsgálták mellékvesekéreg daganatokban, ugyanakkor ezen miRNS-ek expresszióját még nem elemezték hormonálisan inaktív és kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban. Így vizsgálatunk során célul tűztük ki az EV-asszociált keringő miRNS-ek kifejeződésének vizsgálatát e daganat csoportokban.

Jelen munkámban három, keringő EV-eredetű miRNS fokozott kifejeződését tudtuk kimutatni a kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban a hormonálisan inaktív adenomához viszonyítva. Korábbi munkáink eredménye, illetve irodalmi adatok áttekintése után összesen 5 miRNS (hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-320b és hsa-miR-375) expresszióját elemeztük.

A hsa-miR-27a-3p expresszió fokozódását LDDT hatására korábbi, teljes plazmából kiinduló vizsgálatunkban már leírtuk [188]. Jelen munkánkban sikeresen bizonyítottuk, hogy ez az eltérés EV-eredetű miRNS esetén is igazolható. Velazquez-Fernandez és munkatársai a szöveti miRNS expressziós mintázatát vizsgálta hormonálisan inaktív és aktív ACA-ban [4]. Ebben a munkában kimutatták, hogy a hsa-miR-22-3p a legnagyobb mértékben felülexpresszált miRNS CPA-ban normál szövethez viszonyítva, míg a hsa-miR-320b az egyik legjelentősebben fokozott kifejeződést mutató miRNS volt CPA csoportban NFA-hoz képest. Munkacsoportunk korábbi, szöveti miRNS-eket vizsgáló tanulmányában eltérő expresszióját írta le a hsa-miR-210-3p-nek és a hsa-miR-375-nek CPA és ACC között [113]. Csak a hsa-miR-320b esetén találtunk szignifikánsan eltérő expressziót CPA és CP-ACC között. Míg a hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p és hsa-

miR-210-3p kifejeződésében nem volt szignifikáns különbség a jóindulatú és rosszindulatú kortizoltermelő daganatok között. Tekintettel arra, hogy a hsa-miR-210-3p csak CP-ACC betegek között expresszáldott felül szignifikáns mértékben NFA-hoz képest, így ezen eltérés feltehetőleg nem a kortizoltermeléssel lehet kapcsolatban, hanem a malignitással [204].

Tekintettel arra, hogy nem rendelkezünk széleskörűen elfogadott referenciagénnel az extracelluláris miRNS kutatási eredmények normalizálásához [139, 190], így jelen munkámban is a szintetikus spike-in kontroll cel-miR-39-et alkalmaztuk.

Tudomásunk szerint nem közöltek le még olyan eredményt, ami alapján a tumor által szekretált EV-asszociált miRNS kifejeződése a nem által befolyásolt lenne. Ezt a mi eredményeink is megerősítették azáltal, hogy nem találtunk eltérést a miRNS-ek expressziójában a CP-ACC csoportban férfiak és a nők között. Így feltehetőleg biológiailag irreleváns a férfiak felülreprezentáltsága a CP-ACC betegek között a NFA és CPA csoporthoz viszonyítva.

A kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban felülexpresszáldó miRNS-ek szöveti eredete nem ismert. A hypercortisolaemiás betegekben jelentkező relatív túlsúly felveti annak a lehetőségét, hogy a fokozott glükokortikoidszint ebben szerepet játszhat. A négy eltérő expressziót mutató miRNS közül háromnál (hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p és hsa-210-3p) nem találtunk szignifikáns eltérést a CPA és CP-ACC csoport között. Ez megerősíti azt a feltevésünk, hogy az általunk észlelt eltérések hormonális hatásokhoz kötöttek. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatában már leírta a teljes plazma eredetű hsa-miR-27a-3p kifejeződésének változását dexametazon illetve, adrenokortikotropin hatására [188]. Ugyanebben a munkánkban a hsa-miR-27a-3p

génjének promoter régiójában *in silico* predikció alapján glükokortikoid-reszponzív element (GRE) jelenlétét azonosítottuk. Jelen munkánkban a miRNS gének promoter régióját vizsgáltuk TFBIND szoftverrel (<http://tfbind.hgc.jp>). Az elemzés alapján a GRE potenciális jelenlétét szintén ki tudtuk mutatni a hsa-miR-22-3p és hsa-miR-320b génjében, míg a hsa-miR-210-3p esetében nem. Ezen megfigyelésünk tovább erősíti a hipotézisünket, miszerint a hypercortisolismus szerepet játszhat e miRNS-ek kifejeződésének fokozódásában. Jelen munkánkban továbbá sikeresen igazoltuk a dexametazon expresszió fokozó hatását EV-eredetű hsa-miR-27a-3p esetében is. Ezen kívül szignifikáns korrelációt találtunk a vizelet szabad kortizol szintje és a hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p és a hsa-miR-320b kifejeződése között. Kapcsolatot tudtunk kimutatni az LDDT utáni kortizolszint és a hsa-miR-22-3p és hsa-miR-320b expressziója között. Így eredményeink megerősítették hipotézisünket, hogy e miRNS-ek és a kortizol között kapcsolat állhat fenn.

A hsa-miR-27a-3p jelentőségét számos élettani és kórélettani folyamatban leírták. Ezek közé tartozik többek között: az érlemeszesedés [205], az angiogenezis, az elhízás, az immunrendszer működése, az inzulin rezisztencia (IR) és a 2-es típusú cukorbetegség (DMII) is [206, 207]. Ezen kívül hipertrófiás kardiomiopátiában marker szerepet tölthet be [208]. A Cushing-szindróma jellemző tünete a proximális izomgyengeség, melynek kialakulásában a miR-27a-3p is szerepet játszhat azáltal, hogy csökkenti az izomfejlődésben fontos szerepet betöltő myostatin kifejeződését [209, 210]. Daganatok közül alacsonyabb kifejeződését írták le nem kissejtes tüdőrákban [211].

Az IR és DM2 kialakulásában szerepet játszhat a hsa-miR-22-3p is [212]. Egér modellen leírták a miR-22-3p fokozott kifejeződését a májban, ami a transzkripciósfaktor 7 (TF7) gátlásán keresztül rontja a glükoneogenezist [213]. A TF7 deregulációja

a Wnt szignál útvonalon keresztül csökkenti az inzulinérzékenységet és emeli az éhomi vércukor szintet [214]. Daganatok kialakulásában is részt vesz szövetspecifikus módon azáltal, hogy befolyásolja az érújdonképződést, a sejtek migrációját és proliferációját illetve a metasztázis kialakításában kulcsfontosságú epithel- mesenchyma átalakulást is [215]. Eltérő kifejeződése ismert prosztatata [216], nyelőcső [217], emlő [218] és gyomor rosszindulatú daganatában [219].

A hsa-miR-320b-t is kapcsolatba hozták a DM2 kialakulásával [220, 221]. Fokozott kifejeződését írták le proliferatív diabeteses retinopathiában szenvedő betegek üvegtestjében is [222]. Vulnerábilis carotis plakk-kal rendelkező páciensek körében alacsonyabb szintjét mutatták ki egészséges egyénekhez képest [220]. Eltérő kifejeződését összefüggésbe hozták számos rosszindulatú daganattal is (többek között: vastag- és végbélrák [223], prosztatarák [224], nem kissejtes tüdőrák [225], emlőrák [226] és májsejtrák [227]).

Ezek alapján elképzelhető, hogy a fentebb részletezett három miRNS szerepet tölthet be a Cushing szindróma talaján kialakuló inzulin rezisztenciában illetve a DM2-ben.

A hsa-miR-210-3p a szervezet fő hypoxia indukálta miRNS-e (hypoxamiR) [228]. Normális oxigénellátottság esetén kifejeződése alacsony, míg hypoxiás állapotban a hypoxia indukálta faktor 1-alfa (HIF-1 α) transzkripciós faktor hatására expressziója nagymértékben fokozódik. A tumorképződést több lépcsőben is segíti: befolyásolja a sejtciklust, az apoptózist, az angiogenezist és a metasztázisképzést is [204, 229]. Több tanulmány is leírta fokozott expresszióját ACC-ben [113, 171], magasabb szintje rosszabb prognózissal társul [172]. Felülexpresszáldását ezen kívül kimutatták még emlőrákban [230], tüdőrákban [231] és hasnyálmirigyrákban is [232].

Következtetésként levonható, hogy az EV-asszociált miRNS-ek eltérő módon expresszálódnak a hormonálisan inaktív és a kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban. E miRNS-ek kortizolszekréciós paraméterekkel való kapcsolata is kimutatható. Feltételezésünk szerint az emelkedett kortizolszint szerepet játszhat az általunk leírt miRNS-ek fokozott kifejeződésben. Mindazonáltal e feltevés igazolásához további, funkcionális vizsgálatok nélkülözhetetlenek.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során először vizsgáltuk a keringő extracelluláris vezikula-eredetű miRNS-ek kifejeződését mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganataiban. Doktori munkám során végzett vizsgálataim eredményei alapján az alábbi következtetéseket lehet levonni:

1.1. Egy piaci forgalomban elérhető kit vizsgálatával egy olyan EV-izolálási módszer hatékonyságát bizonyítottuk, amely a mindennapi klinikai gyakorlatban is felhasználható. A kit eredményei párhuzamosak voltak az ultracentrifugáción alapuló, az eddigi arany standardnak számító, jelentős munka- és időigénnyel járó protokollal, amely klinikai célokra nehezen alkalmazható. Áramlási citometriával mind a kit, mind az UC-val izolált EV-k esetén ki tudtuk mutatni az EV-ra jellemző felszíni markerek közül az annexin V, a CD9 és a CD81 jelenlétét. Dinamikus fényszórás méréssel elvégzett EV méreteloszlás vizsgálata is megerősítette, hogy az általunk izolált EV-k mérettartománya megegyezik a szakirodalomban leírtakkal.

1.2. A nagy áteresztőképességű TLDA A-kártyával elvégzett EV-eredetű miRNS profilozás alapján tendenciózus mértékben eltérően expresszáldó hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszáldását tudtuk kimutatni független és magasabb elemszámú minták esetén RT-qPCR módszerrel ACC-ben szenvedő betegek vérmintáiban ACA csoporthoz viszonyítva.

1.3. A hsa-miR-483-5p diagnosztikai hatékonyságát az ACA és ACC elkülönítésére ROC-analízissel vizsgálva a klinikai gyakorlatban is alkalmazható, kellően magas szenzitivitási (87,5 %) és specificitási (94,44 %) értéket találtunk 0,965 görbe alatti területtel.

1.4. Mind az ultracentrifuga, mind a kit alkalmazásával izolált EV-k esetén sikeresen ki tudtuk mutatni a hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszáldást az ACC betegcsoportban.

1.5. A fentiek alapján az EV-eredetű hsa-miR-483-5p minimálisan invazív biomarker lehet a mellékvesekéreg-rák preoperatív diagnosztikájában.

2.1. Korábbi saját eredményeink és irodalmi adatok alapján kiválasztott 5 miRNS közül a hsa-miR-22-3p, a hsa-miR-27a-3p és hsa-miR-320b szignifikáns mértékben felülexpresszáldott a kortizoltermelő (CPA és CP-ACC) daganatokban NFA-hoz viszonyítva. A hsa-miR-320b CP-ACC-ben is magasabb kifejeződést mutatott CPA-hoz képest. A hsa-miR-210-3p csak CP-ACC-ben expresszáldott felül szignifikáns mértékben NFA-hoz képest. A hsa-miR-375 expressziója nem mutatott eltérést a három betegcsoportban.

2.2. Az eredményeink alapján az EV-eredetű miRNS-ek eltérő módon expresszáldnak hormonálisan inaktív és kortizoltermelő mellékvesekéreg-daganatokban.

3.1. Szignifikáns mértékű korrelációt igazoltunk a kortizolszekréciós paraméterek közül a 24 órás gyűjtött vizelet szabad kortizolszintje és a hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p és hsa-miR-320b expressziója között. A kis dózisú dexametazon teszt utáni másnap reggeli kortizol koncentráció és a hsa-miR-22-3p és hsa-miR-320b kifejeződése között is szignifikáns kapcsolatot mutattunk ki. A basalis reggeli kortizolszint és a miRNS-ek expressziója között kapcsolatot nem tudtunk igazolni.

3.2. A hsa-miR-27a-3p kifejeződését szignifikáns mértékben fokozta a kis dózisú dexametazon teszt fiziológiásan funkcionáló hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengellyel rendelkező egyének esetében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mellékvesekéreg daganatok dignitását megbízhatóan jelző keringő preoperatív biomarker napjainkig nem került leírásra. A daganatra jellemző szöveti és keringő miRNS-eket már vizsgálták, azonban a keringő extracelluláris vezikulák (EV) miRNS mintázatáról e betegcsoportban eddig nem közöltek eredményeket. A hormonálisan inaktív adenoma (NFA) valamint kortizoltermelő adenoma (CPA) és carcinoma (CP-ACC) keringő miRNS mintázatát sem vizsgálták eddig. Munkánk során ezért célul tűztük ki mellékvesekéreg daganatban szenvedő betegek vérmintáiban az EV-k miRNS mintázatának vizsgálatát a diagnosztikában alkalmazható minimálisan invazív, malignitást jelző biomarkerek azonosítása céljából. További célunk volt a miRNS-ek vizsgálata kortizoltermelő és hormonálisan inaktív daganatokban, valamint a mikroRNS-ek és a kortizolszekréciós paraméterek közötti kapcsolat elemzése. Az EV-kat precipitációs és ultracentrifugálási módszerrel is izoláltunk, majd áramlási citometriával és dinamikus fényszórásméréssel vizsgáltuk. A miRNS-ek expressziós profil vizsgálatát Taqman-kártyával végeztük el 6 adenoma (ACA) és 6 ACC esetén. A célzott validálást RT-qPCR-rel hajtottuk végre 18 ACA és 16 ACC esetén. Korábbi eredmények alapján elemeztük a miRNS-ek kifejeződését 13 NFA, 13 CPA és 9 CP-ACC mintában. A miR-101 és a miR-483-5p szignifikáns felülexpresszációkat mutattak ki ACC betegekben ACA-hoz viszonyítva. ROC-analízis alapján a $dCT_{miR-483-5p}$ mutatta a legmagasabb diagnosztikai hatékonyságot (szenzitivitás: 87,5%, specificitás 94,44%). A miR-22-3p, miR-27a-3p és miR-320b szignifikánsan fokozott kifejeződését észleltük a kortizoltermelő daganatokban a NFA-hoz viszonyítva. A miR-320b CP-ACC-ben is magasabb kifejeződést mutatott CPA-hoz képest. Szignifikáns korrelációt tudtunk kimutatni a vizelet szabad kortizolszintje és miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-320b, illetve kis dózisú dexametazon teszt (LDDT) utáni kortizolszint és a miR-22-3p és miR-320b expressziója között. A miR-27a-3p expresszióját szignifikánsan fokozta az LDDT. Következtetesként levonható, hogy az EV-eredetű miR-483-5p alkalmas minimálisan invazív biomarker lehet az ACC preoperatív diagnosztikájában. Emellett az EV miRNS-ek eltérő módon expresszáálódnak hormonálisan inaktív és kortizoltermelő mellékvesekéreg daganatokban, és ezek kortizolszekréciós paraméterekkel való kapcsolata is kimutatható.

8. SUMMARY

There is no available blood-borne biomarker for the preoperative diagnosis of adrenocortical cancer (ACC) to date. Tissue and circulating microRNAs (miRNAs) have been described in adrenocortical tumors (ACT), however, the expression of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs has not been investigated, yet. Moreover, the expression of miRNAs in non-functioning adenoma (NFA), cortisol-producing adenoma (CPA) and cortisol-producing ACC (CP-ACC) has not been compared, yet either. Therefore the first objective of this study was to investigate the expression of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs and their diagnostic potential in plasma samples of patients suffering from ACT. Our second aim was to evaluate the expression of EV-associated miRNAs in hormonally inactive and cortisol-producing ACTs and to investigate the correlation between their expression and cortisol-secreting parameters. The EVs were isolated either by using precipitation or by ultracentrifugation methods. The preparations were assessed by flow cytometry and dynamic light scattering. Preoperative plasma EV samples of 6 ACAs and ACCs were first screened by TaqMan-cards. The validation was performed on 18 ACAs and 16 ACCs by targeted RT-qPCR. Based on previous studies the expression of EV-associated miRNAs were analyzed in 13 NFAs, 13 CPAs and 9 CP-ACCs. Significant overexpression of miR-101 and miR-483-5p in ACC relative to ACA was detected in the validation cohort. ROC-analysis of data revealed $dCT_{miR-483-5p}$ to have the highest diagnostic accuracy (sensitivity: 87.5%, specificity: 94.44%). Significant overexpression of miR-22-3p, miR-27a-3p and miR-320b was observed in both CPA and CP-ACC relative to NFA. miR-320b was significantly overrepresented in CP-ACC relative to CPA. Significant correlation was revealed between circulating miRNA concentrations and urinary free cortisol values for miR-22-3p, miR-27a-3p, hsa-miR-320b and cortisol after low-dose dexamethasone test (LDDT) for miR-22-3p and hsa-miR-320b. miR-27a-3p was significantly stimulated by LDDT. In conclusion, EV-associated miR-483-5p appears to be a promising minimally invasive biomarker in the preoperative diagnosis of ACC. Moreover EV-associated miRNAs are differentially expressed in non-functioning and cortisol-producing ACTs and a correlation between their expression and cortisol-secreting parameters can be detected.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Arnaldi G, Boscaro M. (2012) Adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 26: 405–419.
2. Terzolo M, Stigliano A, Chiodini I, Loli P, Furlani L, Arnaldi G, Reimondo G, Pia A, Toscano V, Zini M, Borretta G, Papini E, Garofalo P, Allolio B, Dupas B, Mantero F, Tabarin A, Italian Association of Clinical Endocrinologists. (2011) AME position statement on adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol*, 164: 851–870.
3. Terzolo M, Bovio S, Pia A, Reimondo G, Angeli A. (2009) Management of adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 233–243.
4. Velázquez-Fernández D, Caramuta S, Özata DM, Lu M, Höög A, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO, Zedenius J. (2014) MicroRNA expression patterns associated with hyperfunctioning and non-hyperfunctioning phenotypes in adrenocortical adenomas. *Eur J Endocrinol*, 170: 583–591.
5. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ, Hammer GD. (2014) Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Rev*, 35: 282–326.
6. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. (2008) The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 1526–1540.
7. Cherradi N. (2016) microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6: 195.
8. Terzolo M, Daffara F, Ardito A, Zaggia B, Basile V, Ferrari L, Berruti A. (2014) Management of adrenal cancer: a 2013 update. *J Endocrinol Invest*, 37: 207–217.
9. Libé R. (2015) Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Front cell Dev Biol*, 3: 45.
10. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat

- MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, Bonnin A, Bricaire H. (1990) Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med*, 322: 1195–1201.
11. Kebebew E, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. (2006) Extent of Disease at Presentation and Outcome for Adrenocortical Carcinoma: Have We Made Progress? *World J Surg*, 30: 872–878.
 12. Hsing AW, Nam JM, Co Chien HT, McLaughlin JK, Fraumeni JF. (1996) Risk factors for adrenal cancer: An exploratory study. *Int J Cancer*, 65: 432–436.
 13. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF, Proye C. (2001) Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg*, 25: 891–897.
 14. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. (2013) Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 4551–4564.
 15. Libé R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, Bertherat J, Volante M, Quinkler M, Chabre O, Bala M, Tabarin A, Beuschlein F, Vezzosi D, Deutschbein T, Borson-Chazot F, Hermesen I, Stell A, Fottner C, Leboulleux S, Hahner S, Mannelli M, Berruti A, Haak H, Terzolo M, Fassnacht M, Baudin E. (2015) Prognostic factors in stage III–IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann Oncol*, 26: 2119–2225.
 16. Bertherat J, Bertagna X. (2009) Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 261–271.
 17. Bougeard G, Sesboue R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, Brugieres L, Chompret A, de Paillerets BB., Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C, Frebourg T, French LFS working group. (2008) Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet*, 45: 535–538.

18. Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, Grisa L, Parise IZS, Pianovski MAD, Fiori CMCM, Ledesma JA, Barbosa JRS, Figueiredo FRO, Sade ER, Ibañez H, Arram SBI, Stinghen ST, Mengarelli LR, Figueiredo MMO, Carvalho DC, Avilla SG, Woiski TD, Poncio LC, Lima GF, Pontarolo R, Lalli E, Zhou Y, Zambetti GP, Ribeiro RC, Figueiredo BC. (2013) Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the *TP53* R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. *J Clin Oncol*, 31: 2619–2626.
19. Cytrynbaum CS, Smith AC, Rubin T, Weksberg R. (2005) Advances in overgrowth syndromes: clinical classification to molecular delineation in Sotos syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 17: 740–746.
20. Igaz P, Wiener Z, Szabó P, Falus A, Gaillard RC, Horányi J, Rácz K, Tulassay Z. (2006) Functional genomics approaches for the study of sporadic adrenal tumor pathogenesis: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 101: 87–96.
21. Soon PSH, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. (2008) Molecular Markers and the Pathogenesis of Adrenocortical Cancer. *Oncologist*, 13: 548–561.
22. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papathomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libe R, de Reynies A, Bertherat J. (2014) Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*, 46: 607–612.
23. Szabó D, Zsippai A, Bendes M, Tömböl Z, Szabó PM, Rácz K, Igaz P. (2010) Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Orv Hetil*, 151: 1163–1170.
24. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, Libé R, René-Corail F, Audebourg A, Vacher-Lavenu M-C, Groussin L, Bertagna X, Dousset B, Bertherat J, Tissier F. (2011) Wnt/ β -catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating

- mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: E419-426.
25. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, Fragoso MCBV, Kuick R, Lerario AM, Simon DP, Soares IC, Starnes E, Thomas DG, Latronico AC, Giordano TJ, Hammer GD. (2012) Progression to Adrenocortical Tumorigenesis in Mice and Humans through Insulin-Like Growth Factor 2 and β -Catenin. *Am J Pathol*, 181: 1017–1033.
 26. Lehmann T, Wrzesinski T. (2012) The molecular basis of adrenocortical cancer. *Cancer Genet*, 205: 131–137.
 27. Coulter CL. (2005) Fetal adrenal development: insight gained from adrenal tumors. *Trends Endocrinol Metab*, 16: 235–242.
 28. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D. (1997) Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol*, 136: 296–303.
 29. Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. (1998) Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1713–1720.
 30. Liu J, Kahri AI, Heikkilä P, Voutilainen R. (1997) Ribonucleic Acid Expression of the Clustered Imprinted Genes, p57KIP2, Insulin-Like Growth Factor II, and H19, in Adrenal Tumors and Cultured Adrenal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1766–1771.
 31. Barreau O, Assié G, Wilmot-Roussel H, Ragazzon B, Baudry C, Perlemoine K, René-Corail F, Bertagna X, Dousset B, Hamzaoui N, Tissier F, de Reynies A, Bertherat J. (2013) Identification of a CpG Island Methylator Phenotype in Adrenocortical Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: E174–184.
 32. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyngess M, Misek DE, Smith AL, Sanders

- D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JMG, Hanash SM. (2003) Distinct Transcriptional Profiles of Adrenocortical Tumors Uncovered by DNA Microarray Analysis. *Am J Pathol*, 162: 521–531.
33. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ. (2005) Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 1819–1829.
 34. Szabó PM, Tamási V, Molnár V, Andrásfalvy M, Tömböl Z, Farkas R, Kövesdi K, Patócs A, Tóth M, Szalai C, Falus A, Rác K, Igaz P. (2010) Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene*, 29: 3163–3172.
 35. Szabó DR, Baghy K, Szabó PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Éder K, Tóth S, Buzás EI, Falus A, Kovalszky I, Patócs A, Rác K, Igaz P. (2014) Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. *Cell Mol Life Sci*, 71: 917–932.
 36. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás É, Micsik T, Nyíró G, Rác G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradszky KF, Rác K, Patócs A, Igaz P. (2015) Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. *Am J Cancer Res*, 5: 3645–3658.
 37. Fassnacht M, Allolio B. (2009) Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 273–289.
 38. Seccia TM, Fassina A, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. (2005) Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. *Endocr Relat Cancer*, 12: 149–159.
 39. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, Krone N, Porfiri E, Opocher G, Bertherat J, Mantero F, Allolio B, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CHL, Bertagna X, Fassnacht M, Stewart PM. (2011) Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting

- malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 3775–3884.
40. Bancos I, Arlt W. (2017) Diagnosis of a malignant adrenal mass: the role of urinary steroid metabolite profiling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 24: 200–207.
 41. Sturgeon C, Shen WT, Clark OH, Duh Q-, Kebebew E. (2006) Risk assessment in 457 adrenal cortical carcinomas: how much does tumor size predict the likelihood of malignancy? *J Am Coll Surg*, 202: 423–430.
 42. Bharwani N, Rockall AG, Sahdev A, Gueorguiev M, Drake W, Grossman AB, Reznick RH. (2011) Adrenocortical Carcinoma: The Range of Appearances on CT and MRI. *Am J Roentgenol*, 196: W706–714.
 43. Ilias I, Sahdev A, Reznick RH, Grossman AB, Pacak K. (2007) The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods. *Endocr Relat Cancer*, 14: 587–599.
 44. Elsayes KM, Mukundan G, Narra VR, Lewis JS, Shirkhoda A, Farooki A, Brown JJ. (2004) Adrenal masses: MR imaging features with pathologic correlation. *Radiographics*, 24 Suppl 1: S73-86.
 45. Groussin L, Bonardel G, Silvéra S, Tissier F, Coste J, Abiven G, Libé R, Bienvenu M, Alberini J-L, Salenave S, Bouchard P, Bertherat J, Dousset B, Legmann P, Richard B, Foehrenbach H, Bertagna X, Tenenbaum F. (2009) 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the diagnosis of adrenocortical tumors: a prospective study in 77 operated patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 1713–1722.
 46. Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, Reiners C, Fassnacht M, Haenscheid H, Beuschlein F, Zink M, Lang K, Allolio B, Schirbel A. (2008) [123 I]Iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2358–2365.
 47. Duregon E, Volante M, Giorcelli J, Terzolo M, Lalli E, Papotti M. (2013) Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical

- carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates. *Hum Pathol*, 44: 822–828.
48. Weiss LM. (1984) Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*, 8: 163–169.
 49. Medeiros LJ, Weiss LM. (1992) New developments in the pathologic diagnosis of adrenal cortical neoplasms. A review. *Am J Clin Pathol*, 97: 73–83.
 50. Tissier F, Aubert S, Leteurtre E, Al Ghuzlan A, Patey M, Decaussin M, Doucet L, Gobet F, Hoang C, Mazerolles C, Monges G, Renaudin K, Sturm N, Trouette H, Vacher-Lavenu MC, Viallon V, Baudin E, Bertagna X, Coste J, Libe R. (2012) Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtual microscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE. *Am J Surg Pathol*, 36: 1194–1201.
 51. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, Libé R, Ardito A, Al Ghuzlan A, Quinkler M, Oßwald A, Ronchi CL, de Krijger R, Feelders RA, Waldmann J, Willenberg HS, Deutschbein T, Stell A, Reincke M, Papotti M, Baudin E, Tissier F, Haak HR, Loli P, Terzolo M, Allolio B, Müller HH, Fassnacht M. (2015) Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *J Clin Endocrinol Metab*, 100: 841–849.
 52. Miller BS, Gauger PG, Hammer GD, Giordano TJ, Doherty GM. (2010) Proposal for modification of the ENSAT staging system for adrenocortical carcinoma using tumor grade. *Langenbeck's Arch Surg*, 395: 955–961.
 53. Fassnacht M, Johansen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B. (2009) Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma. *Cancer*, 115: 243–250.
 54. Lughezzani G, Sun M, Perrotte P, Jeldres C, Alasker A, Isbarn H, Budäus L, Shariat SF, Guazzoni G, Montorsi F, Karakiewicz PI. (2010) The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: A North

American validation. *Eur J Cancer*, 46: 713–719.

55. Ronchi CL, Kroiss M, Sbiera S, Deutschbein T, Fassnacht M. (2014) EJE PRIZE 2014: Current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go? *Eur J Endocrinol*, 171: R1–11.
56. Leboulleux S, Deandreis D, Al Ghuzlan A, Aupérin A, Goéré D, Dromain C, Elias D, Caillou B, Travagli JP, De Baere T, Lumbroso J, Young J, Schlumberger M, Baudin E. (2010) Adrenocortical carcinoma: is the surgical approach a risk factor of peritoneal carcinomatosis? *Eur J Endocrinol*, 162: 1147–1153.
57. Terzolo M, Zaggia B, Allasino B, De Francia S. (2014) Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21: 159–165.
58. Igaz P, Tömböl Z, Szabó PM, Likó I, Rácz K. (2008) Steroid biosynthesis inhibitors in the therapy of hypercortisolism: theory and practice. *Curr Med Chem*, 15: 2734–2747.
59. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L, Matysik S, Eckhardt C, Gardill F, Gehl A, Kendl S, Weigand I, Bala M, Ronchi CL, Deutschbein T, Schmitz G, Rosenwald A, Allolio B, Fassnacht M, Kroiss M. (2015) Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology*, 156: 3895–3908.
60. Berruti A, Fassnacht M, Baudin E, Hammer G, Haak H, Leboulleux S, Skogseid B, Allolio B, Terzolo M. (2010) Adjuvant therapy in patients with adrenocortical carcinoma: a position of an international panel. *J Clin Oncol*, 28: e401–402; author reply e403.
61. Fassnacht M, Hahner S, Polat B, Koschker AC, Kenn W, Flentje M, Allolio B. (2006) Efficacy of Adjuvant Radiotherapy of the Tumor Bed on Local Recurrence of Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 4501–4504.

62. Habra MA, Ejaz S, Feng L, Das P, Deniz F, Grubbs EG, Phan A, Waguespack SG, Ayala-Ramirez M, Jimenez C, Perrier ND, Lee JE, Vassilopoulou-Sellin R. (2013) A Retrospective Cohort Analysis of the Efficacy of Adjuvant Radiotherapy after Primary Surgical Resection in Patients with Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 192–197.
63. Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, Muleti A, Amendola D, Piergrossi P, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. (2008) Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. *Endocr Relat Cancer*, 15: 623–634.
64. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin S, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, Sorbye H, Torpy DJ, Stepan V, Schteingart DE, Arlt W, Kroiss M, Leboulleux S, Sperone P, Sundin A, Hermesen I, Hahner S, Willenberg HS, Tabarin A, Quinkler M, de la Fouchardière C, Schlumberger M, Mantero F, Weismann D, Beuschlein F, Gelderblom H, Wilmink H, Sender M, Edgerly M, Kenn W, Fojo T, Müller HH, Skogseid B; FIRM-ACT Study Group. (2012) Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma. *N Engl J Med*, 366: 2189–2197.
65. Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, Santini D, Vincenzi B, Badalamenti G, Intrivici C, Del Buono S, De Francia S, Kalomirakis E, Ratti R, Angeli A, Dogliotti L, Papotti M, Terzolo M, Berruti A. (2010) Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. *Endocr Relat Cancer*, 17: 445–453.
66. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritte C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M. (2008) Treatment of Advanced Adrenocortical Carcinoma with Erlotinib plus Gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2057–2062.
67. Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B, Fassnacht M. (2010) Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in

- advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 162: 349–356.
68. Berruti A, Sperone P, Ferrero A, Germano A, Ardito A, Priola AM, De Francia S, Volante M, Daffara F, Generali D, Leboulleux S, Perotti P, Baudin E, Papotti M, Terzolo M. (2012) Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 166: 451–458.
 69. Kroiss M, Reuss M, Kühner D, Johanssen S, Beyer M, Zink M, Hartmann MF, Dhir V, Wudy SA, Arlt W, Sbiera S, Allolio B, Fassnacht M. (2011) Sunitinib Inhibits Cell Proliferation and Alters Steroidogenesis by Down-Regulation of HSD3B2 in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2: 27.
 70. Lerario AM, Worden FP, Ramm CA, Hesseltine EA, Hasseltine EA, Stadler WM, Else T, Shah MH, Agamah E, Rao K, Hammer GD. (2014) The combination of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) antibody cixutumumab and mitotane as a first-line therapy for patients with recurrent/metastatic adrenocortical carcinoma: a multi-institutional NCI-sponsored trial. *Horm Cancer*, 5: 232–239.
 71. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, Kroiss M, Quinn DI, Hesseltine E, Ronchi CL, Terzolo M, Choueiri TK, Poondru S, Fleege T, Rorig R, Chen J, Stephens AW, Worden F, Hammer GD. (2015) Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16: 426–435.
 72. Naing A, LoRusso P, Fu S, Hong D, Chen HX, Doyle LA, Phan AT, Habra MA, Kurzrock R. (2013) Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *Br J Cancer*, 108: 826–830.
 73. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of

Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279–289.

74. Nagy Z, Igaz P. (2015) Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy—The Concept of Circulating microRNAs. *EXS*, 106: 3–30.
75. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806–811.
76. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843–854.
77. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75: 855–862.
78. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9: 277–279.
79. Griffiths-Jones S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, 32: D109–111.
80. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 2999–3004.
81. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. (2004) Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res*, 14: 1902–1910.
82. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23: 4051–4060.

83. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415–419.
84. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432: 235–240.
85. Takeiwa T, Taniguchi I, Ohno M. (2015) Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates. *Genes Cells*, 20: 281–291.
86. Murchison EP, Hannon GJ. (2004) miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 223–229.
87. Lund E, Dahlberg JE. (2006) Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71: 59–66.
88. Kawamata T, Tomari Y. (2010) Making RISC. *Trends Biochem Sci*, 35: 368–376.
89. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. (2015) MicroRNA and cancer – A brief overview. *Adv Biol Regul*, 57: 1–9.
90. Hall TMT. (2005) Structure and Function of Argonaute Proteins. *Structure*, 13: 1403–1408.
91. Pratt AJ, MacRae IJ. (2009) The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 284: 17897–17901.
92. He L, Hannon GJ. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5: 522–531.
93. Bartel DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215–233.
94. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, 23: 781–783.

95. Malumbres M. (2013) miRNAs and cancer: An epigenetics view. *Mol Aspects Med*, 34: 863–874.
96. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120: 15–20.
97. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19: 92–105.
98. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9: 102–114.
99. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RHA, Cuppen E. (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 120: 21–24.
100. Igaz I, Igaz P. (2015) Possible role for microRNAs as inter-species mediators of epigenetic information in disease pathogenesis: is the non-coding dark matter of the genome responsible for epigenetic interindividual or interspecies communication? *Med Hypotheses*, 84: 150–154.
101. Perge P, Nagy Z, Decmann Á, Igaz I, Igaz P. (2017) Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for disease pathogenesis. *RNA Biol*, 14: 391–401.
102. Brümmer A, Hausser J. (2014) MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *Bioessays*, 36: 617–626.
103. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD. (2009) New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*, 19: 1175–1183.
104. Doench JG, Sharp PA. (2004) Specificity of microRNA target selection in

translational repression. *Genes Dev*, 18: 504–511.

105. Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. (2011) Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res*, 39: 6845–6853.
106. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455: 64–71.
107. Watanabe Y, Tomita M, Kanai A. (2007) Computational Methods for MicroRNA Target Prediction. *Methods Enzymol*, 427: 65–86.
108. Jin Y, Chen Z, Liu X, Zhou X. (2013) Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. *Methods Mol Biol*, 936: 117–127.
109. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 1: 376–386.
110. Duque-Guimarães DE, de Almeida-Faria J, Ong TP, Ozanne SE. (2017) Pulsed SILAC as a Approach for miRNA Targets Identification in Cell Culture. *Methods Mol Biol*, 1546: 149–159.
111. Lüningschrör P, Hauser S, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. (2013) MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. *Biochim Biophys Acta*, 1833: 1894–1903.
112. Vidigal JA, Ventura A. (2015) The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*, 25: 137–147.
113. Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2009) Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*, 16: 895–906.
114. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M,

- Rácz K, Patócs A. (2010) Down-Regulation of Wee1 Kinase by a Specific Subset of microRNA in Human Sporadic Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: E181–191.
115. Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC. (2011) Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*, 12: 221.
 116. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 15805–15810.
 117. Pelechano V, Wei W, Steinmetz LM. (2015) Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics. *Cell*, 161: 1400–1412.
 118. Parker R. (2012) RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191: 671–702.
 119. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin Y V., Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. (2007) MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. *Science*; 317: 1764–1767.
 120. Pratt AJ, MacRae IJ. (2009) The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 284: 17897–17901.
 121. Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EKL, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ. (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*, 9: 1171–1173.
 122. Salmanidis M, Pillman K, Goodall G, Bracken C. (2014) Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int J Biochem Cell Biol*, 54: 304–311.
 123. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318: 1931–1934.

124. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 1608–1613.
125. Huang V, Place RF, Portnoy V, Wang J, Qi Z, Jia Z, Yu A, Shuman M, Yu J, Li LC. (2012) Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Res*, 40: 1695–1707.
126. Turchinovich A, Burwinkel B. (2012) Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol*, 9: 1066–1075.
127. Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281–297.
128. Alvarez-Garcia I, Miska EA. (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132: 4653–4662.
129. Wang XH. (2013) MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16: 258–266.
130. Follert P, Cremer H, Béclin C. (2014) MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability. *Front Mol Neurosci*, 7: 5.
131. Zhang N, Lin J, Chen J, Liu X, Liu J, Luo H, Li Y, Cui S. (2013) MicroRNA 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF) regulating pro-opiomelanocortin (POMC) expression by targeting mitogen-activated protein kinase 8. *J Biol Chem*, 288: 10361–10373.
132. Li X. (2014) miR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene*, 533: 1–4.
133. Lee HM, Nguyen DT, Lu LF. (2014) Progress and challenge of microRNA research in immunity. *Front Genet*, 5: 178.
134. Iorio MV, Croce CM. (2012) microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 33: 1126–1133.
135. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub

- TR. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834–838.
136. Chen CZ. (2005) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*, 353: 1768–1771.
 137. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 54: 482–490.
 138. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18: 997–1006.
 139. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10513–10518.
 140. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56: 1733–1741.
 141. Nagy Z, Decmann Á, Perge P, Igaz P. (2018) A mikro-RNS-ek patogenetikai és diagnosztikai szerepe mellékvesekéreg-carcinomában. *Orv Hetil*, 159: 245–251.
 142. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee MLT, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3: e3694.
 143. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-

density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13: 423–433.

144. Aucher A, Rudnicka D, Davis DM. (2013) MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation. *J Immunol*, 191: 6250–6260.
145. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, Tuschl T. (2013) Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 4255–4260.
146. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B. (2016) Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. *Trends Biochem Sci*, 41: 883–892.
147. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. (2011) MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*, 8: 467–477.
148. Klopfeisch R, Weiss ATA, Gruber AD. (2011) Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol*, 26: 797–810.
149. McDonald JS, Milosevic D, Reddi H V, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. (2011) Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*, 57: 833–840.
150. Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, Blighe K, Marchese SD, Hills A, Woodley L, Stebbing J, Coombes RC, Shaw JA. (2013) Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids.. *PLoS One*, 8: e77963.
151. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39: 7223–7233.
152. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs

- independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 5003–5008.
153. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 38: 7248–7259.
 154. Lee Y, EL Andaloussi S, Wood MJ. (2012) Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*, 21: R125–134.
 155. Théry C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9: 581–593.
 156. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9: 654–659.
 157. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68: 2667–2688.
 158. Janas T, Janas MM, Sapoń K, Janas T. (2015) Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett*, 589: 1391–1398.
 159. Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. (2010) Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*, 5: e13515.
 160. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. (2012) Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*, 13: 357.
 161. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogosova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M. (2014) Quantitative

and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 14888–14993.

162. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GXY, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. (2011) MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet*, 43: 854–859.
163. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*, 103: 1044–1052.
164. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. (2010) Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J Biol Chem*, 285: 17442–17452.
165. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, Zini N, Middeldorp JM, Ylstra B, de Menezes RX, Würdinger T, Meijer GA, Pegtel DM. (2014) Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep*, 8: 1649–1658.
166. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4: 2980.
167. Soon PSH, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. (2009) miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res*, 15: 7684–7692.
168. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. (2011) MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*, 117: 1630–1639.

169. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiss J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW. (2011) Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol*, 64: 529–535.
170. Feinmesser M, Benbassat C, Meiri E, Benjamin H, Lebanony D, Lebenthal Y, de Vries L, Drozd T, Spector Y. (2015) Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate With Weiss Histopathologic System. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 23: 522–531.
171. Özata DM, Caramuta S, Velázquez-Fernández D, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO. (2011) The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 18: 643–655.
172. Duregon E, Rapa I, Votta A, Giorcelli J, Daffara F, Terzolo M, Scagliotti GV, Volante M, Papotti M. (2014) MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. *Hum Pathol*, 45: 1555–1562.
173. Koperski Ł, Kotlarek M, Świerniak M, Kolanowska M, Kubiak A, Górnicka B, Jażdżewski K, Wójcicka A. (2017) Next-generation sequencing reveals microRNA markers of adrenocortical tumors malignancy. *Oncotarget*, 8: 49191–49200.
174. Gara SK, Wang Y, Patel D, Liu-Chittenden Y, Jain M, Boufraquech M, Zhang L, Meltzer PS, Kebebew E. (2015) Integrated genome-wide analysis of genomic changes and gene regulation in human adrenocortical tissue samples. *Nucleic Acids Res*, 43: 9327–9339.
175. Igaz P, Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rácz K. (2015) MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell Mol Life Sci*, 72: 417–428.
176. Ma N, Wang X, Qiao Y, Li F, Hui Y, Zou C, Jin J, Lv G, Peng Y, Wang L, Huang H, Zhou L, Zheng X, Gao X. (2011) Coexpression of an intronic

microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. *Mol Cell Endocrinol*, 333: 96–101.

177. Caramuta S, Lee L, Ozata DM, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO. (2013) Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 20: 551–564.
178. Yu X, Li Z. (2016) The role of microRNAs in the adrenocortical carcinomas. *Tumour Biol*, 37: 1515–1519.
179. Szabó DR, Luconi M, Szabó PM, Tóth M, Szücs N, Horányi J, Nagy Z, Mannelli M, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2014) Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Lab Invest*, 94: 331–339.
180. Chabre O, Libé R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, Feige JJ, Cherradi N. (2013) Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 20: 579–594.
181. Patel D, Boufraquech M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, Gulati N, Nilubol N, Fojo T, Kebebew E. (2013) MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery*, 154: 1224–1228; discussion 1229.
182. Salvianti F, Canu L, Poli G, Armignacco R, Scatena C, Cantini G, Di Franco A, Gelmini S, Ercolino T, Pazzagli M, Nesi G, Mannelli M, Pinzani P, Luconi M. (2017) New insights in the clinical and translational relevance of miR483-5p in adrenocortical cancer. *Oncotarget*, 8: 65525–65533.
183. Lötvalld J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin I V, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3: 26913.
184. Frisken BJ. (2001) Revisiting the method of cumulants for the analysis of

dynamic light-scattering data. *Appl Opt*, 40: 4087–4091.

185. Butz H, Patócs A. (2015) Technical Aspects Related to the Analysis of Circulating microRNAs. *EXS*, 106: 55–71.
186. Fornari F, Ferracin M, Trerè D, Milazzo M, Marinelli S, Galassi M, Venerandi L, Pollutri D, Patrizi C, Borghi A, Foschi FG, Stefanini GF, Negrini M, Bolondi L, Gramantieri L. (2015) Circulating microRNAs, miR-939, miR-595, miR-519d and miR-494, Identify Cirrhotic Patients with HCC. *PLoS One*, 10: e0141448.
187. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, Beissbarth T, Kuner R, Sültmann H. (2011) Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*, 128: 608–616.
188. Igaz I, Nyíró G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. (2015) Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin. *Int J Endocrinol*, 2015: 589230.
189. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. (2014) Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 11: 145–156.
190. Occhipinti G, Giulietti M, Principato G, Piva F. (2016) The choice of endogenous controls in exosomal microRNA assessments from biofluids. *Tumour Biol*, 37: 11657–11665.
191. Li Y, Zhang L, Liu F, Xiang G, Jiang D, Pu X. (2015) Identification of Endogenous Controls for Analyzing Serum Exosomal miRNA in Patients with Hepatitis B or Hepatocellular Carcinoma. *Dis Markers*, 2015:893594.
192. Emmerling VV, Fischer S, Kleemann M, Handrick R, Kochanek S, Otte K. (2016) miR-483 is a self-regulating microRNA and can activate its own expression via USF1 in HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 80: 81–86.
193. Liu M, Roth A, Yu M, Morris R, Bersani F, Rivera MN, Lu J, Shioda T, Vasudevan S, Ramaswamy S, Maheswaran S, Diederichs S, Haber DA. (2013) The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal

promoters and enhances tumorigenesis. *Genes Dev*, 27: 2543–2548.

194. Yang ZG, Ma XD, He ZH, Guo YX. (2017) miR-483-5p promotes prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting RBM5. *Int Braz J Urol*, 43: 1060-1067.
195. Song Q, Xu Y, Yang C, Chen Z, Jia C, Chen J, Zhang Y, Lai P, Fan X, Zhou X, Lin J, Li M, Ma W, Luo S, Bai X. (2014) miR-483-5p Promotes Invasion and Metastasis of Lung Adenocarcinoma by Targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res*, 74: 3031–3042.
196. Zong L, Meng L, Shi R. (2015) Role of miR-101 in pheochromocytoma patients with SDHD mutation. *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 1545–1554.
197. Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, Ma YY, Jiang XT, Xia YJ, Ye ZY, Tao HQ. (2010) MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer*, 46: 2295–2303.
198. Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzzi G, Lazzarini G, Spisni E, Pantaleo MA, Biasco G, Tomasi V. (2009) MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Exp Cell Res*, 315: 1439–1447.
199. Hao Y, Gu X, Zhao Y, Greene S, Sha W, Smoot DT, Califano J, Wu TC, Pang X (2011) Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway in vivo. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4: 1073–1083.
200. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. (2007) Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 7: 1009–1019.
201. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötval J, Nolte-‘t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2013: 2.
202. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ.

- (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, 273: 20121–20127.
203. Chakraborty C, Das S. (2016) Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumor Biol*, 37: 5705–5714.
 204. Dang K, Myers KA. (2015) The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci*, 16: 6353–6372.
 205. Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. (2012) The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 222: 314–323.
 206. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SLT, Wong MTK, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. (2012) Circulating miRNA Profiles in Patients with Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E2271–2276.
 207. Geer EB, Islam J, Buettner C. (2014) Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 43: 75–102.
 208. Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Da Costa Martins P, Contaldi C, Saccani Jotti G, Franzone A, Galastri L, Latronico MVG, Imbriaco M, Esposito G, De Windt L, Betocchi S, Condorelli G. (2014) Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 63: 920–927.
 209. McFarlane C, Vajjala A, Arigela H, Lokireddy S, Ge X, Bonala S, Manickam R, Kambadur R, Sharma M. (2014) Negative auto-regulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and microRNA-27. *PLoS One*, 9: e87687.
 210. Song CZ, Tian X, Gelehrter TD. (1999) Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor-beta signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 11776–11781.
 211. Heegaard NHH, Schetter AJ, Welsh JA, Yoneda M, Bowman ED, Harris CC.

- (2012) Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*, 130: 1378–1386.
212. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. (2011) MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 474: 649–653.
 213. Kaur K, Vig S, Srivastava R, Mishra A, Singh VP, Srivastava AK, Datta M. (2015) Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. *Diabetes*, 64: 3659–3669.
 214. Kaur K, Pandey AK, Srivastava S, Srivastava AK, Datta M. (2011) Comprehensive miRNome and in silico analyses identify the Wnt signaling pathway to be altered in the diabetic liver. *Mol Biosyst*, 7: 3234–3244.
 215. Wang J, Li Y, Ding M, Zhang H, Xu X, Tang J. (2017) Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review). *Int J Oncol*, 50: 345–355.
 216. Knyazev EN, Samatov TR, Fomicheva KA, Nyushko KM, Alekseev BY, Shkurnikov MY. (2016) MicroRNA hsa-miR-4674 in Hemolysis-Free Blood Plasma Is Associated with Distant Metastases of Prostatic Cancer. *Bull Exp Biol Med*, 161: 112–115.
 217. Yang C, Ning S, Li Z, Qin X, Xu W. (2014) miR-22 is down-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and inhibits cell migration and invasion. *Cancer Cell Int*, 14: 138.
 218. Damavandi Z, Torkashvand S, Vasei M, Soltani BM, Tavallaei M, Mowla SJ. (2016) Aberrant Expression of Breast Development-Related MicroRNAs, miR-22, miR-132, and miR-212, in Breast Tumor Tissues. *J Breast Cancer*, 19: 148–155.
 219. Yang M, Jiang N, Cao Q, Sun Q. (2016) EDD1 predicts prognosis and regulates gastric cancer growth in vitro and in vivo via miR-22. *Biol Chem*, [Epub ahead

of print]

220. Zhang R, Qin Y, Zhu G, Li Y, Xue J. (2016) Low serum miR-320b expression as a novel indicator of carotid atherosclerosis. *J Clin Neurosci*, 33: 252–258.
221. Li Y, Qiu C, Tu J, Geng B, Yang J, Jiang T, Cui Q. (2014) HMDD v2.0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations. *Nucleic Acids Res*, 42: D1070-1074.
222. Hirota K, Keino H, Inoue M, Ishida H, Hirakata A. (2015) Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 253: 335–342.
223. Lieb V, Weigelt K, Scheinost L, Fischer K, Greither T, Marcou M, Theil G, Klocker H, Holzhausen H-J, Lai X, Vera J, Ekici AB, Horninger W, Fornara P, Wullich B, Taubert H, Wach S. (2018) Serum levels of miR-320 family members are associated with clinical parameters and diagnosis in prostate cancer patients. *Oncotarget*, 9: 10402–10416.
224. Wang H, Cao F, Li X, Miao H, E J, Xing J, Fu C. (2015) miR-320b suppresses cell proliferation by targeting c-Myc in human colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 15: 748.
225. Bronisz A, Godlewski J, Wallace JA, Merchant AS, Nowicki MO, Mathsyraraja H, Srinivasan R, Trimboli AJ, Martin CK, Li F, Yu L, Fernandez SA, Pécot T, Rosol TJ, Cory S, Hallett M, Park M, Piper MG, Marsh CB, Yee LD, Jimenez RE, Nuovo G, Lawler SE, Chiocca EA, Leone G, Ostrowski MC. (2011) Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. *Nat Cell Biol*, 14: 159–167.
226. Yao J, Liang LH, Zhang Y, Ding J, Tian Q, Li JJ, He XH. (2012) GNAI1 Suppresses Tumor Cell Migration and Invasion and is Post-Transcriptionally Regulated by Mir-320a/c/d in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biol Med*, 9: 234–241.

227. Lei T, Zhu Y, Jiang C, Wang Y, Fu J, Fan Z, Qin H. (2016) MicroRNA-320 was downregulated in non-small cell lung cancer and inhibited cell proliferation, migration and invasion by targeting fatty acid synthase. *Mol Med Rep*, 14: 1255–1262.
228. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M.(2011) miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life*, 63: 94–100.
229. Li L, Huang K, You Y, Fu X, Hu L, Song L, Meng Y. (2014) Hypoxia-induced miR-210 in epithelial ovarian cancer enhances cancer cell viability via promoting proliferation and inhibiting apoptosis. *Int J Oncol*, 44: 2111–2120.
230. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J. (2008) hsa-miR-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 14: 1340–1348.
231. Puisségur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, Maurin T, Lebrigand K, Cardinaud B, Hofman V, Fourre S, Magnone V, Ricci JE, Pouysségur J, Gounon P, Hofman P, Barbry P, Mari B. (2011) miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ*, 18: 465–478.
232. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H. (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*, 126: 73–80.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. **Perge P**, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, Nyíró G, Decmann Á, Pap E, Luconi M, Mannelli M, Buzás EI, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2017) Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. Sci Rep, 7(1): 5474.

Impakt faktor 2016: 4,259

2. **Perge P**, Decmann Á, Pezzani R, Bancos I, Fassina A, Luconi M, Canu L, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2018) Analysis of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in cortisol-producing adrenocortical tumors. Endocrine, 59(2): 280–287.

Impakt faktor 2016: 3,131

10.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. **Perge P**, Decmann A, Igaz P. (2015) A neuroendokrin daganatok kezelése szomatosztatinanalogokkal. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 68(6): 317-322.

2. **Perge P**, Nagy Z, Igaz I, Igaz P. (2015) Suggested roles for microRNA in tumors. BIOMOLECULAR CONCEPTS 6(1): 149-155.

3. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás E, Micsik T, Nyirő G, Rác G, Butz H, **Perge P**, Kovalszky I, Medzihradsky KF, Rác K, Patócs A, Igaz P. (2015) Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH 5(12): 3645-3658.

Impakt faktor: 3,425

4. Igaz I, Nyirő G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, **Perge P**, Sahin P, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A. (2015) Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2015:589230.

Impakt faktor: 2,376

5. **Perge P**, Nagy Z, Decmann A, Igaz I, Igaz P. (2017) Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for disease pathogenesis. RNA BIOLOGY 14(4): 391-401.

Impakt faktor 2016: 3,9

6. Nagy Z, Szabó PM, Grolmusz VK, **Perge P**, Igaz I, Patócs A, Igaz P. (2017) MEN1 and microRNAs: The link between sporadic pituitary, parathyroid and adrenocortical tumors? MEDICAL HYPOTHESES 99: 40-44.

Impakt faktor 2016: 1,066

7. Decmann A, **Perge P**, Nagy Z, Butz H, Patócs A, Igaz P. (2017) Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában. ORVOSI HETILAP 158(13): 483-490.

Impakt faktor 2016: 0,349

8. Decmann Á, **Perge P**, Tóth M, Igaz P. (2018) Adrenal myelolipoma: a comprehensive review. Endocrine 59(1): 7-15.

Impakt faktor 2016: 3,131

9. Nagy Z, Decmann A, **Perge P**, Igaz P. (2018) A mikro-RNS-ek patogenetikai és diagnosztikai szerepe mellékvesekéreg-carcinomában ORVOSI HETILAP 159(7): 245-251.

Impakt faktor 2016: 0,349

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyon szépen köszönöm témavezetőmnek, **Prof. Dr. Igaz Péter** egyetemi tanár úrnak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi igazgatójának, hogy PhD munkám témavezetőjeként minden nap számíthattam értékes szakmai tanácsaira, és mindvégig töretlen lelkesedéssel támogatott és formálta kutatói szemléletem. Köszönöm továbbá a szakmai és emberi példamutatását is!

Szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Dr. Rácz Károly** és **Prof. Dr. Tóth Miklós** tanár uraknak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika volt igazgatóinak, hogy kutatómunkámat mindvégig támogatták. Nagyon köszönöm értékes szakmai tanácsaikat és javaslatukat is!

Köszönöm **Dr. Tulassay Zsolt** és **Dr. Tulassay Tivadar** professzor uraknak, a Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola volt és jelenlegi vezetőinek, hogy doktori munkámat mindenben támogatták és lehetőséget biztosítottak kutatásom elvégzésére.

Köszönöm TDK munkám témavezetőjének, **Dr. Patócs Attila** egyetemi docens úrnak, hogy kutatómunkám kezdetén is messzemenően támogatott és segített. Továbbá kiemelkedő szakmai tudásával PhD-kutatásom alatt mindvégig hasznos tanácsokkal látott el, melyek számottevően javították közös publikációink színvonalát!

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Buzás Edit** professzor asszonynak és **Pálóczi Krisztina** intézeti mérnöknek a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársainak az extracelluláris vezikula preparátumok és az áramlási citometriai vizsgálatok tekintetében. Köszönöm **Mészáros Tamás** mérnöknek, a SeroScience Kft.

és Nanomedicina Kutató és Oktató Központ munkatársának a dinamikus fényszórás mérés elvégzése és értékelése miatt.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika endokrin munkacsoportja minden tagjának valamint az Endokrin Genetikai Laboratórium posztdoktor kutatóinak (**Dr. Butz Henriett, Dr. Doleschall Márton, Dr. Nyíró Gábor**), volt és jelenlegi PhD hallgatóinak (**Dr. Decmann Ábel, Fülöpné Németh Kinga, Dr. Grolmusz Vince, Dr. Kövesdi Annamária, Dr. Molnár Ágnes, Dr. Nagy Zoltán, Dr. Nagy Zsolt, Dr. Sarkadi Balázs, Dr. Stark Júlia és Dr. Sumánszki Csaba**) és asszisztensnek (**Benkő Mariann**) mindennapos szakmai segítségüket valamint a Laboratóriumra jellemző baráti légkör biztosítását. Továbbá a **Szteroid és Izotóp laboratórium és a Klinika összes dolgozójának**, hogy bármikor segítségért fordulhattam hozzájuk.

Nem utolsó sorban pedig köszönettel tartozom **páromnak, szüleimnek és testvéreimnek** a sok szeretetért, türelemért és támogatásért, amit az évek során kaptam tőlük. Nélkülük ez a munka nem születhetett volna meg. Nagyon köszönöm szüleim töretlen biztatását és önzetlen támogatását, valamint példamutató emberi tartásukat!